



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Βιοχημικός Χαρακτηρισμός Του Μεταλλάγματος 1-523 Της Πολυ(Α)-Εξειδικευμένης Ριβονουκλεάσης

Biochemical Characterization of Mutant Poly(A)-Specific Ribonuclease 1-523

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΑΡΑΜΕΤΟΣ ΗΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2015

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Υπεύθυνος Καθηγητής:

Νικόλαος Α. Μπαλατσός, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τριμελής Επιτροπή:

Δημήτριος Δ. Λεωνίδας, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Βασιλική Θ Σκαμνάκη, Λέκτορας Βιοχημείας- Μεταβολισμού του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου Νικόλαο Μπαλατσό για την αποδοχή στο εργαστήριο δομικής και λειτουργικής βιοχημείας καθώς και για το πολύ ενδιαφέρον θέμα με το οποίο ασχολήθηκα κατά την εκπόνηση της πτυχιακής μου ασκήσης. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Αθανάσιο Κυρίτση, Βυρων Γοργογιέτα και την υποψήφια διδάκτορα Χαντζηλεοντιάδου Δήμητρα για την υπομονή τους και την σωστή καθοδήγηση σε κάθε σημείο της πτυχιακής μου ασκήσης. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου δομικής και λειτουργικής βιοχημείας για την άψογη συνεργασία μας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πολυ(Α) ουρά των ώριμων ευκαρυωτικών mRNAs διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη μεταφορά, τη μετάφραση, την αποικοδόμησή τους και τη σταθερότητά τους, παρέχοντας ένα σημαντικό μέσο ελέγχου των επιπέδων τους στο κυτταρόπλασμα. Η αποικοδόμηση των mRNAs ξεκινά συνήθως με τη βράχυνση της πολυ(Α) ουράς, και καταλύεται από ειδικά ένζυμα γνωστά ως αποαδενυλάσες. Μια από τις καλύτερα μελετημένες αποαδενυλάσες είναι η πολυ(Α)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση, PARN. Το ένζυμο είναι ομοδιμερές. Η ανθρώπινη PARN αποτελείται από 639 κατάλοιπα και μέχρι σήμερα έχει προσδιοριστεί η κρυσταλλική δομή της PARN 1-430. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε, *in vitro*, η ενεργότητα του μεταλλάγματος PARN(1-523) σε σχέση με αυτή του αγρίου τύπου. Η εργασία ανοίγει το δρόμο για περαιτέρω μελέτες για την αποκάλυψη του πλήρους καταλυτικού μηχανισμού της PARN.

ABSTRACT

The poly(A) tail plays a crucial role in mature eukaryotic mRNA transport, translation, degradation and stability, providing a widespread means of controlling mRNA levels in the cytoplasm. mRNA degradation usually begins with the shortening of poly(A) tail and is catalyzed by specific enzymes known as deadenylases. One of the well-studied deadenylases is poly(A)-specific ribonuclease, PARN. The enzyme is a homodimer. The human PARN consists of 639 residues and the crystal structure of PARN 1-430 has been determined. In the present study, examined, *in vitro*, the activity of the mutant PARN(1-523) relative to that of wild type. This study paves the way for further studies to uncover the full catalytic mechanism of PARN.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή	7 σελ.
1.1 Σύνθεση του RNA και μετάφραση του	7 σελ.
1.2 Το ευκαρυωτικό mRNA τροποποιείται κατά τη διάρκεια ή μετά το πέρας της μεταγραφής του	8 σελ.
1.3 Ωρίμανση και σταθερότητα mRNA	9 σελ.
1.3.1 Το 5' άκρο του ευκαρυωτικού mRNA φέρει καλύπτρα	9 σελ.
1.3.2 Το 3' άκρο πολυαδενυλιώνεται	11 σελ.
1.4 Αποικοδόμηση του mRNA	13 σελ.
1.4.1 Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA	13 σελ.
1.5 Αποαδενυλίωση	15 σελ.
1.6 Σύμπλοκα αποαδενυλασών	17 σελ.
1.7 Ρύθμιση της αποαδενυλίωσης	18 σελ.
1.8 Ένζυμα και έλεγχος αποαδενυλίωσης	20 σελ.
1.9 Η πολυ(A) - εξειδικευμένη ριβονουκλεάση [poly(A) - specific ribonuclease, PARN]	21 σελ.
1.10 Φυλογενετική ανάλυση της PARN και ο σημαντικός ρόλος της Arg9	24 σελ.

2. Σκοπός της εργασίας	25 σελ.
3. Υλικά και μέθοδοι	26 σελ.
3.1 Υλικά	26 σελ.
3.2 Διαλύματα	29 σελ.
3.3 Μέθοδοι	32 σελ.
4. Αποτελέσματα	42 σελ.
5. Συζήτηση	48 σελ.
6. Βιβλιογραφία	50 σελ.

1. Εισαγωγή

Το DNA αποθηκεύει τις γενετικές πληροφορίες σε μια σταθερή μορφή, η οποία μπορεί εύκολα να αντιγραφεί. Ωστόσο, η έκφραση αυτών των γενετικών πληροφοριών προϋποθέτει τη ροή της από το DNA στο RNA στις πρωτεΐνες. Το RNA είναι ένα μόριο κεντρικής σημασίας για τη γονιδιακή έκφραση. Η εμπλοκή του RNA σε πολλές λειτουργίες που αφορούν τη γονιδιακή έκφραση υποστηρίζει τη γενική άποψη ότι ολόκληρη η διαδικασία μπορεί να έχει εξελιχθεί σε έναν «κόσμο RNA», στον οποίο αρχικά το RNA ήταν το ενεργό συστατικό του μηχανισμού διατήρησης και έκφρασης της γενετικής πληροφορίας. Αργότερα οι πρωτεΐνες υποβοήθησαν ή ανέλαβαν αποκλειστικά πολλές από αυτές τις λειτουργίες, γεγονός που έχει ως συνέπεια την αύξηση της προσαρμοστικότητας και πιθανόν της αποτελεσματικότητας. Οι τρεις κύριες τάξεις RNA που εμπλέκονται άμεσα στην παραγωγή πρωτεϊνών είναι: το αγγελιοφόρο RNA (mRNA), το μεταφορικό RNA (tRNA) και το ριβοσωμικό RNA (rRNA). Η γονιδιακή έκφραση πραγματοποιείται σε δύο στάδια: στη μεταγραφή όπου παράγει ένα μονόκλωνο μόριο RNA όμοιο στην αλληλουχία με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA και στη μετάφραση όπου μετατρέπει τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του mRNA στην αλληλουχία των αμινοξέων που αποτελούν μια πρωτεΐνη.

1.1 Σύνθεση του RNA και μετάφραση του

Η σύνθεση του RNA, ή μεταγραφή, είναι η διεργασία της μεταγραφής των πληροφοριών της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA σε πληροφορίες αλληλουχίας RNA. Η σύνθεση του RNA καταλύεται από ένα μεγάλο ένζυμο που ονομάζεται RNA πολυμεράση. Η σύνθεση του RNA, όπως σχεδόν όλες οι βιολογικές αντιδράσεις πολυμερισμού, πραγματοποιείται σε τρία στάδια: την έναρξη την επιμήκυνση και τον τερματισμό. Η χημεία της σύνθεσης του RNA είναι ίδια για όλες τις μορφές RNA, η συνθετική διεργασία διαφέρει κυρίως στη ρύθμιση, στη μετα-μεταγραφική επεξεργασία και στην ειδική πολυμεράση η οποία συμμετέχει. Ένα μόριο mRNA δε μεταφράζεται σε ολόκληρο το μήκος του, αλλά κάθε mRNA περιέχει τουλάχιστον μία κωδική περιοχή, η οποία σχετίζεται σε μια πρωτεϊνική αλληλουχία μέσω του γενετικού κώδικα: κάθε νουκλεοτιδική τριπλέτα (κωδικόνιο) της κωδικής περιοχής αντιστοιχεί σε ένα αμινοξύ. Η

αλυσίδα του DNA που φέρει την ίδια αλληλουχία με το mRNA (με εξαίρεση ότι περιέχει T αντί για U) και ονομάζεται κωδική αλυσίδα ή αντισημαίνουσα αλυσίδα.

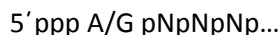
1.2 Το ευκαρυωτικό mRNA τροποποιείται κατά τη διάρκεια ή μετά το πέρας της μεταγραφής του

Η παραγωγή του ευκαρυωτικού mRNA περιλαμβάνει επιπρόσθετα στάδια μετά τη μεταγραφή. Η μεταγραφή γίνεται με το συνήθη τρόπο, ξεκινώντας με τη δημιουργία ενός μεταγράφου με 5' τριφωσφορικό άκρο. Ωστόσο, το 3' άκρο δημιουργείται αποκόπτοντας ένα τμήμα του μεταγράφου και όχι τερματίζοντας τη μεταγραφή σε μια καθορισμένη θέση. Όσα RNA προέρχονται από γονίδια που περιέχουν ιντρόνια πρέπει να υποστούν μάτισμα, ώστε να αφαιρεθούν τα ιντρόνια και να παραχθεί ένα μικρότερο mRNA που περιέχει μία άθικτη κωδική αλληλουχία. Τροποποιούνται και οι δύο άκρες του μεταγράφου με την προσθήκη επιπλέον νουκλεοτιδίων. Το 5' άκρο του RNA τροποποιείται αμέσως μετά την εμφάνιση του, εξαιτίας της προσθήκης μιας καλύπτρας. Το 3' άκρο τροποποιείται εξαιτίας της προσθήκης μιας σειράς νουκλεοτιδίων αδενολικού οξέος [πολυαδενολικό οξύ ή πολυ(A), poly(A)] αμέσως μετά την αποκοπή του. Μόνο μετά την ολοκλήρωση όλων των τροποποιήσεων και της επεξεργασίας μπορεί το mRNA να εξαχθεί από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Κατά μέσο όρο, το mRNA καθυστερεί ~20 λεπτά για να εξέλθει από τον πυρήνα. Μόλις το mRNA εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, αναγνωρίζεται από τα ριβοσώματα και μεταφράζεται. Το ευκαρυωτικό mRNA αποτελεί μόνο ένα μικρό ποσοστό το συνολικού κυτταρικού RNA (~3% της μάζας του). Ο χρόνος ημιζωής των mRNA στους ζυμομύκητες είναι σχετικά μικρός και κυμαίνεται από 1 έως 60 λεπτά. Υπάρχει μια αξιοσημείωτη αύξηση της σταθερότητας στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς: το mRNA των ζωικών κυττάρων είναι σχετικά σταθερό, με χρόνο ημιζωής μεταξύ 1 και 24 ωρών. Τα ευκαρυωτικά πολυσώματα είναι σχετικά σταθερά. Οι τροποποιήσεις και στα δυο άκρα του mRNA συνεισφέρουν σε αυτή τη σταθερότητα.

1.3 Ωρίμανση και σταθερότητα mRNA

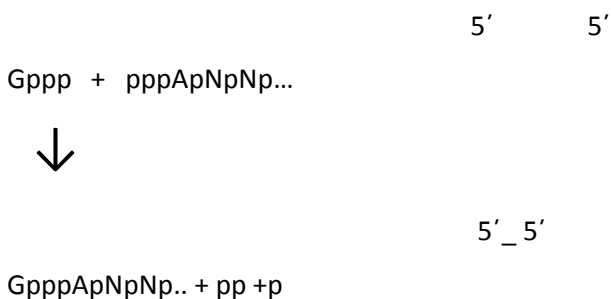
1.3.1 Το 5' άκρο του ευκαρυωτικού mRNA φέρει καλύπτρα

Τα ευκαρυωτικά πολυσώματα είναι σχετικά σταθερά. Οι τροποποιήσεις και στα δύο άκρα του mRNA συνεισφέρουν σε αυτή τη σταθερότητα. Η μεταγραφή αρχίζει μένα τριφωσφορικό νουκλεοσίδιο (συνήθως μία πουρίνη, A ή G). Το πρώτο νουκλεοτίδιο διατηρεί την 5' τριφωσφορική ομάδα του και δημιουργεί το συνήθη φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ της 3' θέσης του και της 5' θέσης του επόμενου νουκλεοτιδίου [2]. Η αρχική αλληλουχία του μεταγράφου μπορεί να αναπαρασταθεί ως:

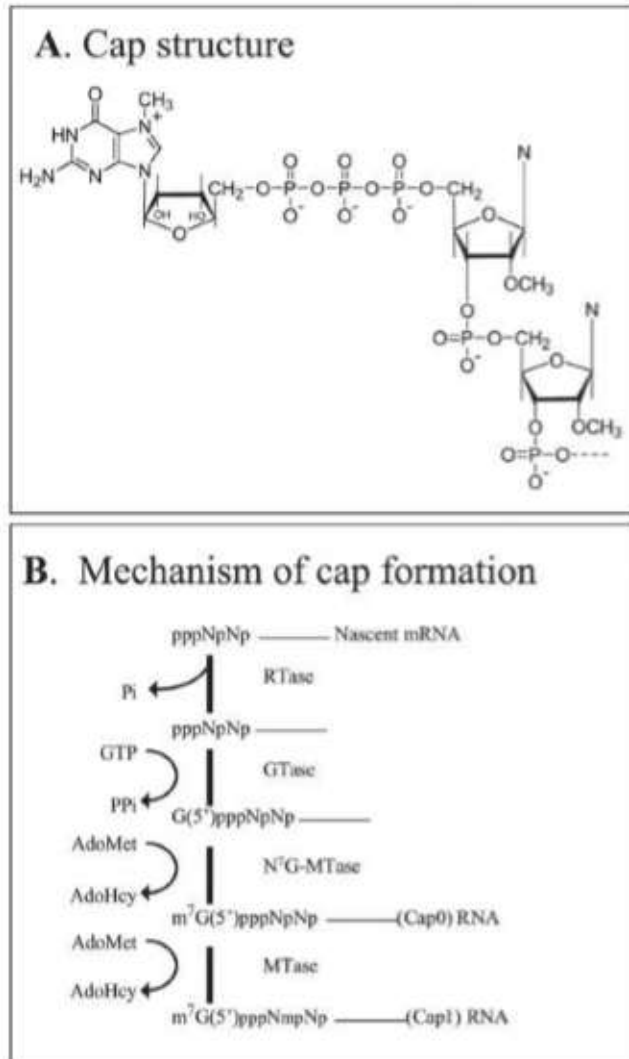


Ωστόσο, αν το ώριμο mRNA επεξεργαστεί in vitro με ένζυμα τα οποία θα έπρεπε να το αποικοδομήσουν σε μεμονωμένα νουκλεοτίδια, το 5' άκρο δεν παράγει το αναμενόμενο τριφωσφορικό νουκλεοσίδιο. Αντίθετα, περιλαμβάνει δύο νουκλεοτίδια συνδεδεμένα με 5'-5' τριφωσφορικό δεσμό, ενώ φέρει και μεθυλομάδες. Η ακραία βάση είναι πάντα μια γουανίνη, η οποία προστίθεται στο αρχικό μόριο RNA μετά τη μεταγραφή. Η προσθήκη της G στο 5' άκρο καταλύεται από ένα πυρηνικό ένζυμο, τη γουανυλυλο-τρανφεράση. Η αντίδραση αυτή συμβαίνει τόσο σύντομα μετά την έναρξη της μεταγραφής, που δεν είναι δυνατόν να ανιχνευθούν παρά μόνο ίχνη του αρχικού 5' τριφωσφορικού άκρου στο πυρηνικό RNA. Η συνολική αντίδραση μπορεί να αναπαρασταθεί ως μια συμπύκνωση μεταξύ του GTP και του αρχικού 5' τριφωσφορικού άκρου του RNA.

Συνεπώς:



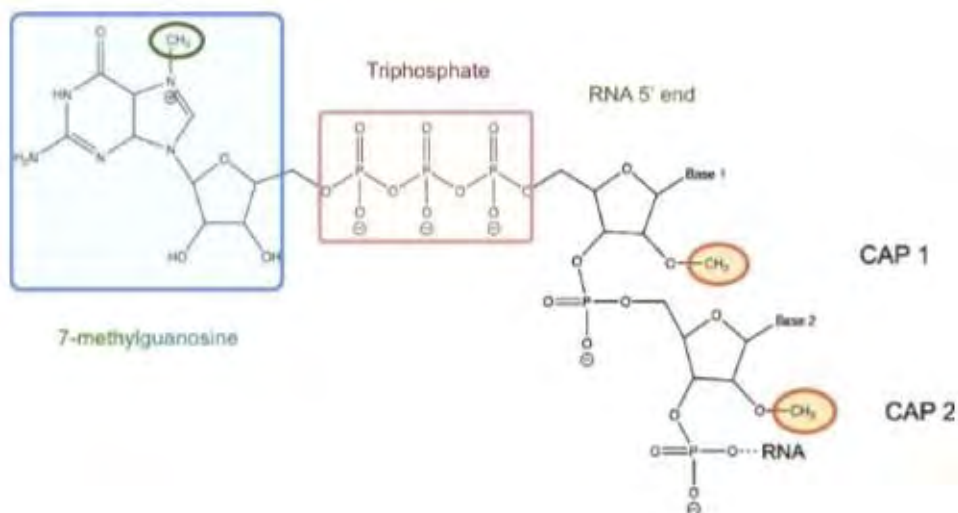
Τονέο κατάλοιπο G, που προστίθεται στο άκρο του RNA, έχει τον αντίστροφο προσανατολισμό από όλα τα άλλα νουκλεοτίδια. Αυτή η δομή ονομάζεται καλύπτρα (cap) και αποτελεί υπόστρωμα για αρκετές αντιδράσεις μεθυλίωσης (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Α) Χημική δομή της καλύπτρας και Β) Μηχανισμός δημιουργίας της καλύπτρας.

Οι τύποι των καλυπτρών διακρίνονται από το πλήθος των μεθυλίσεων που έχουν συμβεί. Το N-7 της τελικής γουανίνης μεθυλιώνεται από την S- αδενοςυλομεθειονίνη για να σχηματιστεί η καλύπτρα στη θέση 0. Οι παρακείμενες ριβόζες μπορούν να μεθυλιωθούν και να σχηματιστεί το κάλυμμα 1 ή το κάλυμμα 2 (Εικόνα 2). Τα καλύμματα συμβάλουν στη σταθερότητα των μορίων mRNA, προστατεύοντας τα 5'-άκρα τους από τη δράση φωσφατασών

και νουκλεασών. Επιπλέον, τα καλύμματα ενισχύουν τη μετάφραση του mRNA από τα ευκαρυωτικά συστήματα σύνθεσης πρωτεϊνών.

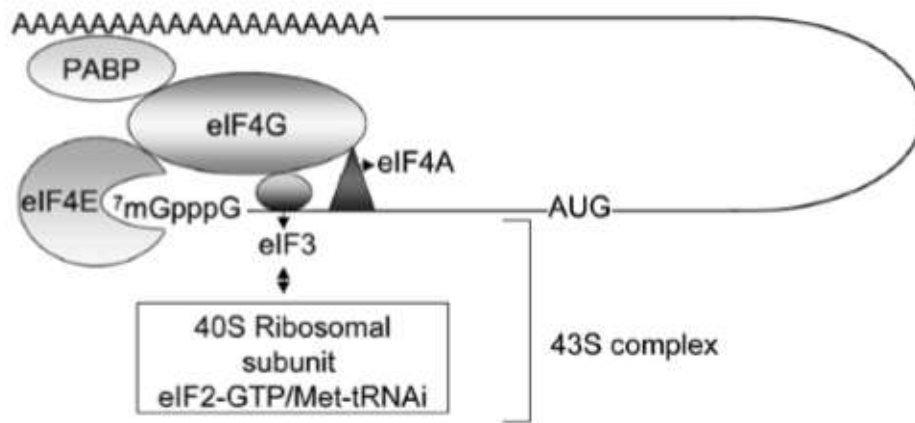


Εικόνα 2. Οι διάφοροι τύποι καλυπτρών διακρίνονται ανάλογα με το πλήθος των μεθυλιώσεων που έχουν συμβεί. Η θέση μεθυλίωσης 0 της N-7 είναι στο κυανό πλαίσιο σε κύκλο, οι θέσεις μεθυλίωσης 1 και 2 δείχνονται ως CAP1 και CAP2, αντίστοιχα.

1.3.2 Το 3' άκρο πολυαδενυλιώνεται

Η 3' τερματική αλληλουχία από κατάλοιπα Α συχνά περιγράφεται ως ουρά πολυ(Α), ενώ το mRNA που έχει αυτό το χαρακτηριστικό δηλώνεται ως πολυ(Α)+ [poly(A)+]. Η αλληλουχία πολυ(Α) δεν κωδικοποιείται στο DNA, αλλά προστίθεται στο RNA, μέσα στο πυρήνα, μετά τη μεταγραφή. Η προσθήκη της πολυ(Α) καταλύεται από το ένζυμο πολυ(Α) πολυμεράση [poly(A) polymerase], η οποία προσθέτει ~200 νουκλεοτίδια μονοφωσφορικής αδενοσίνης (Α) στο ελεύθερο 3'-OH άκρο του mRNA [3]. Η αλληλουχία πολυ(Α) είναι συνδεδεμένη με μία πρωτεΐνη που ονομάζεται πολυ(Α)-συνδεόμενη πρωτεΐνη (PABP, Poly(A)-Binding Protein). Συγγενικές μορφές αυτής της πρωτεΐνης απαντώνται σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Ένα μονομερές PABP των ~70kD συνδέεται σε κάθε 10-20 βάσεις της ουράς πολυ(Α). Έτσι, ένα κοινό χαρακτηριστικό σε πολλούς ή στους περισσότερους ευκαρυώτες είναι ότι το 3' άκρο του mRNA αποτελείται από μία αλληλουχία πολυ(Α), η οποία είναι προσδεδεμένη σε μία μεγάλη πρωτεϊνική μάζα. Η προσθήκη της πολυ(Α) πραγματοποιείται ως μέρος μιας αντίδρασης στην οποία το 3' άκρο του mRNA δημιουργείται

και τροποποιείται από ένα σύμπλοκο ενζύμων. Η πρόσδεση της PABP στον παράγοντα έναρξης eIF4G δημιουργεί ένα κλειστό βρόχο, στον οποίο τα 5' και 3' άκρα του mRNA συγκρατούνται στο ίδιο πρωτεϊνικό σύμπλοκο (Εικόνα 3). Ο σχηματισμός αυτού του συμπλόκου μπορεί να ευθύνεται για κάποιες από τις επιδράσεις της πολυ(A) στις ιδιότητες του mRNA. Η πολυ(A) συνήθως σταθεροποιεί το mRNA. Η ικανότητα της πολυ(A) να προστατεύει το mRNA από την αποικοδόμηση απαιτεί τη σύνδεση της με την PABP.



Εικόνα 3. Η πρόσδεση της PABP στον παράγοντα έναρξης eIF4G δημιουργεί ένα κλειστό βρόχο, στον οποίο τα 5' και 3' άκρα του mRNA συγκρατούνται στο ίδιο πρωτεϊνικό σύμπλοκο [50].

Η αφαίρεση της πολυ(A) αναστέλλει την έναρξη της μετάφρασης in vitro και η μείωση της PABP έχει το ίδιο αποτέλεσμα στο ζυμομύκητα in vivo. Αυτές οι επιδράσεις μπορεί να εξαρτώνται από την πρόσδεση της PABP στο σύμπλοκο έναρξης, στο 5' άκρο του mRNA. Υπάρχουν πολλά παραδείγματα στην πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη όπου η αποαδενυλίωση ενός συγκεκριμένου μορίου mRNA συσχετίζεται με τη μετάφραση του. Σε μερικές περιπτώσεις, τα mRNA αποθηκεύονται σε μη αποαδενυλιωμένη μορφή και η πολυ(A) προστίθεται όταν είναι απαραίτητη η μετάφρασή τους. Σε άλλες περιπτώσεις, τα πολυ(A)+ mRNA αποαδενυλιώνονται, με συνέπεια τη μείωση της μετάφρασής τους.

1.4 Αποικοδόμηση του mRNA

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι μια σύνθετη διαδικασία που περιλαμβάνει τον έλεγχο του ρυθμού μεταγραφής, την επεξεργασία και σταθερότητα του mRNA, τον ρυθμό της μετάφρασης και την σταθερότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης. Στο επίπεδο του mRNA το σημαντικότερο σημείο ελέγχου αφορά την σταθερότητα του μορίου. Ανάλυση μικροσυστοιχιών έχει αποκαλύψει ότι το 40–50% των αλλαγών γονιδιακής έκφρασης σε απόκριση σε διάφορα κυτταρικά σήματα συμβαίνει σε επίπεδο σταθερότητας του mRNA [4,5]. Αυτές οι αλλαγές προκαλούνται συνήθως από μεταβολές στην σύσταση των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων με αποτέλεσμα είτε να αναστέλλεται είτε να διευκολύνεται η αποικοδόμηση. Πολλοί κυτταρικοί παράγοντες και μηχανισμοί είναι αφιερωμένα στον συντονισμό του ρυθμού της αποικοδόμησης του mRNA. Κατά την διάρκεια των τελευταίων πέντε ετών, τα περισσότερα από τα ένζυμα που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση του mRNA έχουν ταυτοποιηθεί και ξεκινάει η διαλεύκανση της σύνθετης ρύθμισης που καθορίζει την πορεία και τον ρυθμό της αποικοδόμησης του mRNA [1].

1.4.1 Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA

Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την αποαδενυλίωση

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς το μεγαλύτερο ποσοστό των mRNAs αποικοδομείται μέσω του μονοπατιού αποικοδόμησης εξαρτώμενο από αποαδενυλίωση, το οποίο ξεκινά με τη βράχυνση της πολυ(A) ουράς. Στον πυρήνα, με τη διαδικασία της αποαδενυλίωσης περιορίζονται οι νέο-προστιθέμενες πολυ(A) ουρές, στο κατάλληλο μήκος, ώστε το mRNA να εξαχθεί στο κυτταρόπλασμα και να ξεκινήσει η μετάφραση του, ενώ η εκτεταμένη αποαδενυλίωση του mRNA στο κυτταρόπλασμα πέρα από ένα συγκεκριμένο μήκος, σηματοδοτεί την αποικοδόμηση του. Η αποαδενυλίωση καταλύεται από τις αποαδενυλάσες, που είναι μαγνήσιο-εξαρτώμενες εξωριβονουκλεάσες, δηλαδή υδρολύουν RNA με κατεύθυνση 3' → 5' και πραγματοποιείται κυρίως από το σύμπλοκο Ccr4-Not καθώς και από το σύμπλοκο PARN. Μετά την αποαδενυλίωση, δύο μηχανισμοί μπορούν να οδηγήσουν στην αποικοδόμηση του mRNA: είτε αφαίρεση της 5' καλύπτρας και αποικοδόμηση με

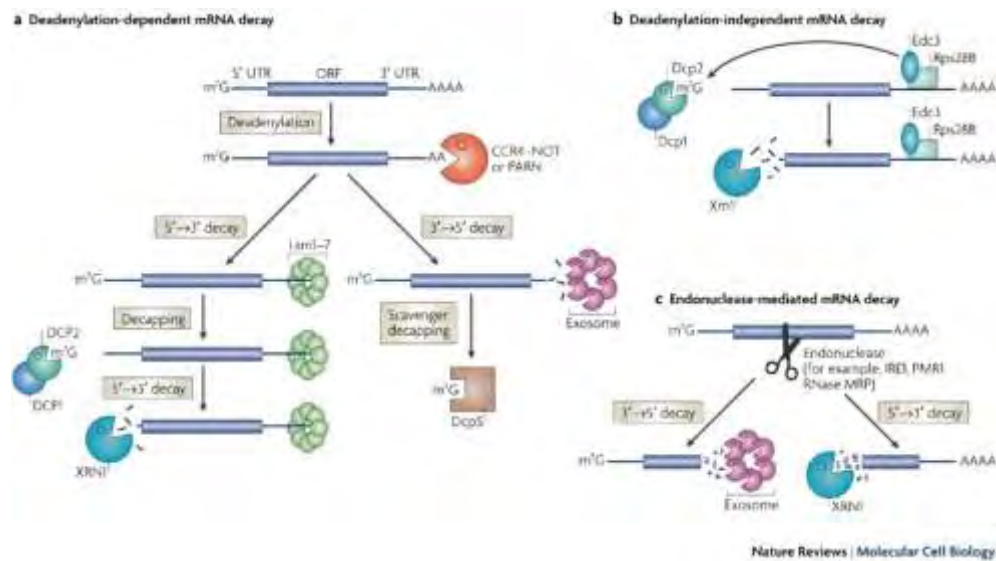
κατεύθυνση 5'→3', είτε αποικοδόμηση 3'→5'. Στο πρώτο μονοπάτι, το σύμπλεγμα πρωτεϊνών Lsm 1-7 αλληλεπιδρά με το 3' άκρο του μεταγράφου επάγωντας την αφαίρεση της καλύπτρας μέσω του συμπλόκου Dcp1-Dcp2 και εκθέτωντας έτσι το μετάγραφο σε αποικοδόμηση από την Xrn1p, μια 5'→3' εξωνουκλεάση. Εναλλακτικά, το αποαδενυλιωμένο mRNA μπορεί να αποικοδομηθεί με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα, ένα σύμπλοκο εξωνουκλεασών. Στη περίπτωση αυτή η καλύπτρα υδρολυσείται από το ένζυμο DcpS [6]. Να σημειωθεί ότι ο ρυθμός της αποαδενυλίωσης ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων mRNAs και εξαρτάται από τη σίγηση miRNA, την ύπαρξη πρόωρων κωδικονίων τερματισμού και καθοριστών σταθερότητας που βρίσκονται στην 3' αμετάφραστη περιοχή, όπως είναι οι περιοχές πλούσιες σε AU αλληλουχίες ή ARE (Εικόνα 4).

Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την αφαίρεση της καλύπτρας

Δύο μετάγραφα που δεν σχετίζονται μεταξύ τους, τα RPS28B και EDC1, παρακάμπτουν το στάδιο της αποαδενυλίωσης, και αφαιρείται η καλύπτρα με έναν αυτορυθμιστικό μηχανισμό (Εικόνα 4). Η πρωτεΐνη Rps28B προσδένεται σε μία δομή θηλιάς στην 3' αμετάφραστη περιοχή του δικού της μεταγράφου και στρατολογεί την Edc3, έναν προαγωγέα της αφαίρεσης της. Αυτό επιφέρει σύνδεση και άλλων παραγόντων αφαίρεσης της καλύπτρας και επιτρέπει την αποικοδόμηση που είναι ανεξάρτητη από την αποαδενυλίωση [5]. Επίσης, Το EDC1 mRNA του *S. Cerevisiae*, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Edc1 που ρυθμίζει την αφαίρεση της καλύπτρας, αποικοδομείται με πορείες ανεξάρτητες της αποαδενυλίωσης. Στην περίπτωση αυτή η αποαδενυλίωση φαίνεται να προλαμβάνεται από την αλληλεπίδραση της πολυ(A) ουράς και μία περιοχή πολυ(U) που βρίσκεται στο 3' UTR. Αυτό το ενδομοριακό ζευγάρωμα βάσεων εμποδίζει την πρόσβαση των αποαδενυλασών. Ο μηχανισμός αυτός είναι ένας μηχανισμός ανατροφοδοτικής ρύθμισης όπου το προϊόν της μετάφρασης αποικοδομεί το μετάγραφο του. Η αφαίρεση του EDC1 mRNA απαιτεί την παρουσία υπομονάδων του συμπλόκου Ccr4-Not γεγονός που υποδηλώνει συσχέτιση μεταξύ αφαίρεσης της καλύπτρας και αποαδενυλίωσης.

Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από ενδονουκλεοτιδική διάσπαση

Ένας αποτελεσματικός τρόπος αποικοδόμησης του mRNA είναι μέσω ενδονουκλεοτιδικής διάσπασης, όπου παράγονται δύο τμήματα που είναι ευάλωτα σε εξωνουκλεάσες (Εικόνα 4). Διάφορες ενδονουκλεάσες που στοχεύουν το mRNA έχουν χαρακτηριστεί πρόσφατα συμπεριλαμβανομένου τις PMR1, IRE1 και το ένζυμο επεξεργασίας του ριβοσωμικού RNA (RNase MRP) το οποίο φαίνεται να επιτελεί επιπρόσθετο ρόλο αφού επιτίθεται και σε συγκεκριμένα μόρια mRNA. Επιπλέον ενδονουκλεάσες φαίνεται να εμπλέκονται στην αποικοδόμηση ελαττωματικών mRNAs [8,9] ενώ τα siRNAs ξεκινούν την αποικοδόμηση μέσω ενδονουκλεοτιδικής διάσπασης όπου εμπλέκεται η Argonaute protein-2 (Ago2) [10,11].

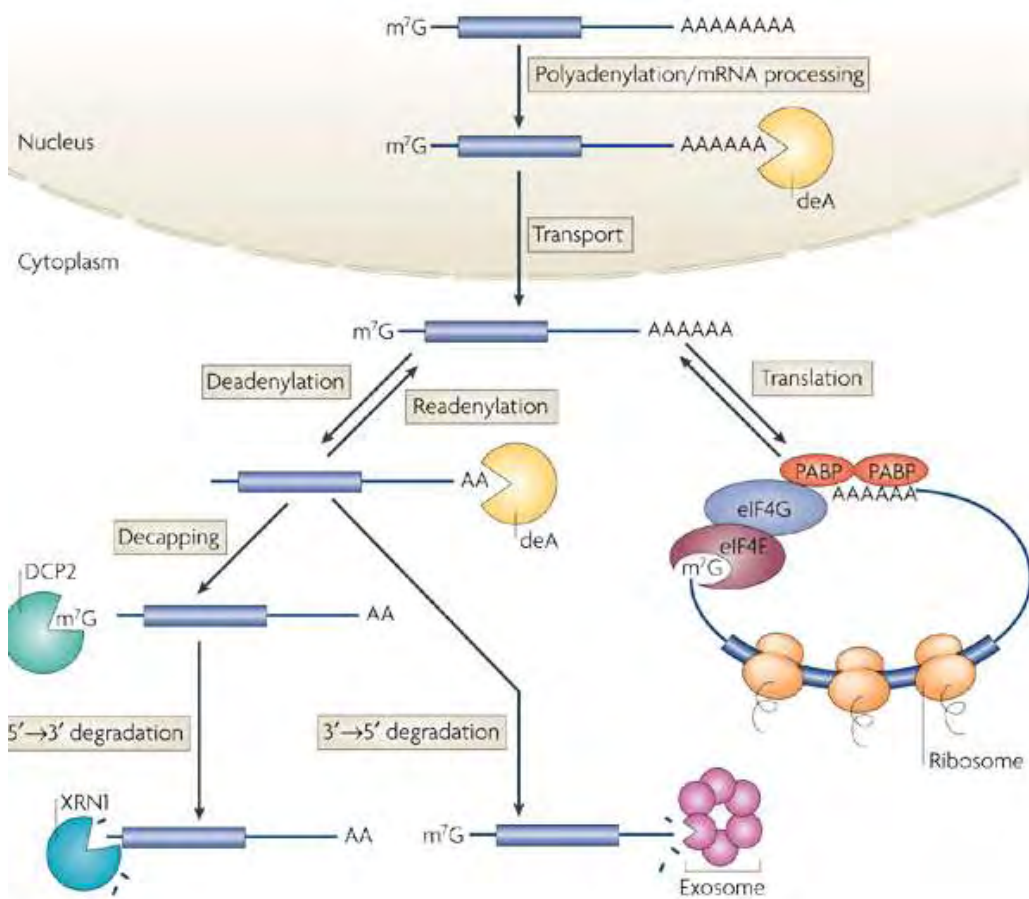


Εικόνα 4. Α.Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από αποαδενυλίωση. Β.Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την αφαίρεση της καλύπτρας Γ.Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από ενδονουκλεοτιδική διάσπαση [7].

1.5Αποαδενυλίωση

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η αποικοδόμηση του mRNA υπό φυσιολογικές συνθήκες συνήθως ξεκινάει από την βράχυνση της πολυ(A) ουράς. Η αποαδενυλίωση είναι το σημαντικότερο στάδιο που καθορίζει το ρυθμό της αποικοδόμησης και της μεταφραστικής

αποσιώπησης του mRNA. Το γεγονός αυτό καθιστά την αποαδενυλίωση ως το κυριότερο σημείο ελέγχου για τις δύο αυτές διαδικασίες. Τα ένζυμα που καταλύουν την αποαδενυλίωση είναι εξωνουκλεάσες εξαρτώμενες από Mg^{2+} που υδρολύουν το mRNA με κατεύθυνση 3'-5', παράγοντας 5'-AMP. Οι πολυ(A) ουρές είναι το κυριότερο υπόστρωμα των ενζύμων αυτών, ωστόσο μερικές αποαδενυλάσες μπορούν να διασπούν και άλλα μόρια RNA in vitro [12,13]. Από την στιγμή που η πολυ(A) ουρά έχει αφαιρεθεί από το mRNA, άλλα υδρολυτικά ένζυμα ξεκινούν την διάσπαση του (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Η αποαδενυλίωση είναι συνήθως το στάδιο που καθορίζει το ρυθμό της αποικοδόμησης και της αποσιώπησης του mRNA [7].

Ο αριθμός των γνωστών αποαδενυλασών έχει επεκταθεί πρόσφατα, κυρίως μέσω βιοχημικών και γενετικών μελετών. Υποψήφιες αποαδενυλάσες έχουν ταυτοποιηθεί με χρήση

προγραμμάτων βιοπληροφορικής, ωστόσο η δράση τους δεν έχει αποδειχθεί. Σύμφωνα με συγκριτικές μελέτες των περιοχών με δράση ριβονουκλεάσης των ενζύμων αυτών, όλες οι γνωστές αποαδενυλάσες ανήκουν σε μία από της δύο ομάδες, την DEDD ή την εξωνουκλεάση-ενδονουκλεάση-φωσφατάση (EEP) υπέρ-οικογένεια. Οι DEDD νουκλεάσες ονομάστηκαν έτσι εξαιτίας των συντηρημένων καταλυτικών αμινοξικών καταλοίπων Asp και Glu τα οποία είναι διάσπαρτα σε τρία μοτίβα εξωνουκλεάσης που δεσμεύουν ιόντα μαγνησίου. Μέλη της ομάδας αυτής περιλαμβάνουν τις οικογένειες της Por2 (γνωστή και ως Caf1), της πολυ(A) εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης (PARN), την Caf1Z, και την Pan2. Τα ένζυμα της ομάδας EEP περιλαμβάνουν την Ccr4, την Nocturinin, την ANGEL και 2' phosphodiesterase (2' PDE) και έχουν συντηρημένα κατάλοιπα Asp και His στην περιοχή με δράση νουκλεάσης. Είναι πιθανό να υπάρχουν και άλλες νουκλεάσες εκτός των υπέρ-οικογενειών DEDD και EEP ωστόσο δεν έχει ταυτοποιηθεί καμία ακόμη [14].

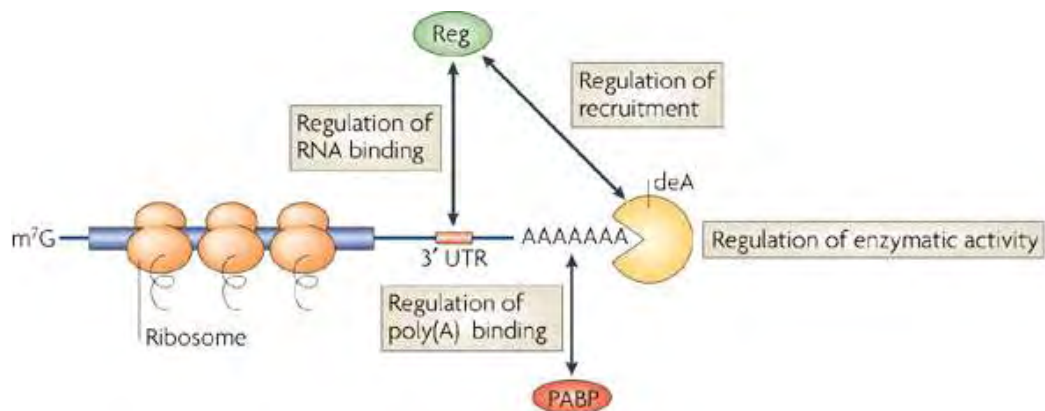
1.6 Σύμπλοκα αποαδενυλασών

Οι αποαδενυλάσες συνήθως σχηματίζουν σύμπλοκα. Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στα σύμπλοκα αυτά μπορεί να επηρεάζουν την δραστικότητα των αποαδενυλασών. Για παράδειγμα, η αποαδενυλάση Pan2 προσδένεται στην Pan3 η οποία με την σειρά της αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη PABP 4. Η PABP ρυθμίζει την δράση του συμπλόκου Pan2-Pan3 προσελκύοντας το στην πολυ(A) ουρά. Κάποιες πολυαδενυλάσες σχηματίζουν ομο- ή ετεροδιμερή (Εικόνα 7). Σε κάποιες περιπτώσεις ο ομοδιμερισμός είναι απαραίτητος για την ενεργότητα της [15]. Η Ccr4 και η Por2 σχηματίζουν ετεροδιμερή στο *S. Cerevisiae* [16]. Επίσης ο ετεροδιμερισμός επεκτείνει το ρεπερτόριο των αποαδενυλασών στα θηλασικά. Επτά διακριτά σύμπλοκα μεταξύ των αποαδενυλασών έχουν καταγραφεί [17,18]. Διάφορα ετεροδιμερή μπορεί να έχουν διαφορετική ενζυμική ή ρυθμιστική ικανότητα. Σε αυτή την κατηγορία ανήκει η CNOT8 η οποία είναι μέλος της Por2 οικογένειας και έχει την ικανότητα να προσδένεται στην PUF ρυθμιστική πρωτεΐνη περισσότερο από ότι προσδένεται η CNOT7, ένα άλλο μέλος της Por2 οικογένειας [19]. Ανώτερα σύμπλοκα όσον αφορά το επίπεδο οργάνωσης προσθέτουν επιπλέον λειτουργίες και ρυθμιστική δυνατότητα. Υπάρχουν ειδικά ετεροδιμερή αποτελούμενα από την Ccr4 και την Por2 πρωτεΐνη σε διάφορα είδη, συνδέονται με πρωτεΐνες Not για να σχηματίσουν μεγάλα συμπλέγματα πολλαπλών υπομονάδων [16,17]. Το σύμπλοκο

Ccr4-Pop2-NOT εμφανίζεται σε διαφορετικές μορφές με μοριακά βάρη να κυμαίνονται από 0,65 έως 2 MDa [16]. Οι πρωτεΐνες Notμπορούν να δρουν ως συνδέτες: η NOT4 της *D. Melanogaster* συνδέει το σύμπλοκο αποαδενυλίωσης σε μία 3'UTR ρυθμιστική πρωτεΐνη. Μεταξύ ετεροδιμερών και υψηλού επιπέδου πολυπλοκότητας συμπλόκων στα οποία μπορούν να προσδένονται διαφορετικά, το ρεπερτόριο των αποαδενυλασών και του βιολογικού τους ρόλου είναι αρκετά εκτενές.

1.7Ρύθμιση της αποαδενυλίωσης

Η ρύθμιση της δράσης των αποαδενυλασών είναι αναγκαία, καθώς μη φυσιολογική αποαδενυλίωση επιφέρει γενική απορρύθμιση. Σταθερά και μεταφραζόμενα mRNA πρέπει να προστατεύονται από την αφαίρεση της πολυ(A) ουράς, ενώ μη σταθερά ή προβληματικά mRNA πρέπει να αποαδενυλιώνονται και να αποικοδομούνται [20,21]. Ταχεία αποαδενυλίωση συγκεκριμένων στόχων ξεχωρίζει σημαντικά από την φυσιολογική αποαδενυλίωση. Έτσι οι αποαδενυλάσες πρέπει να ρυθμίζονται γενικά αλλά και ειδικά σύμφωνα με τον στόχο.



Εικόνα 7. Οι αποαδενυλάσες ρυθμίζονται γενικά αλλά και ειδικά σύμφωνα με το στόχο [7].

Οι αποαδενυλάσες και οι ρυθμιστές τους εκφράζονται σε δεδομένη χρονική στιγμή και τόπο όταν μπορεί να υπάρχει και η ρύθμιση τους. Άλλες αποαδενυλάσες, όπως μέλη της Por2 και Ccr4 οικογένειας εκφράζονται ευρέως και σταθερά. Ένας δεύτερος μηχανισμός για γενική ρύθμιση της αποαδενυλίωσης είναι η αναστολή της ενζυμικής δράσης. Ειδικά στρεσογόνα, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, οξειδωτικά, οσμωτική πίεση ή θερμικό στρες, έλλειψη γλυκόζης αναστέλλουν την αποαδενυλίωση, ενώ μελέτες επί της ανθρώπινης PARN δείχνουν ότι αναστέλλεται από νουκλεοτίδια και συνθετικά τους ανάλογα. Η αποαδενυλίωση επηρεάζεται από δύο τοπολογικά διακριτές μορφές ελέγχου: α) πυρηνική -κυτταροπλασματική και β) εντοπισμός σε κοκκία [22]. Διάφορες αποαδενυλάσες κινούνται παλινδρομικά από τον πυρήνα στον κυτταρόπλασμα. Αλλαγές στην διαμερισματοποίηση επιφέρουν δραματικά αποτελέσματα. Στα αμφίβια, αποσύνθεση του πυρήνα κατά την μείωση απελευθερώνει την PARN στο κυτταρόπλασμα όπου και αποαδενυλιώνει μητρικά mRNA. Διάφορες αποαδενυλάσες εντοπίζονται σε ενδοκυτταρικά κοκκία. Τα γαμετοκύτταρα, τα νευρωνικά κοκκία και τα σωμάτια P (P bodies) περιέχουν mRNA μόρια σε καταστολή τα οποία μπορούν να ενεργοποιηθούν [24]. Ο συνεντοπισμός των ενζύμων με τα υποστρώματα μπορεί να διεγείρει την αποαδενυλίωση αλλά αυτό δεν έχει αποδειχθεί πλήρως. Από την άλλη η αποαδενυλίωση δεν φαίνεται να περιορίζεται στα κοκκία γιατί οι ίδιες αποαδενυλάσες έχουν βρεθεί και στο κυτταρόπλασμα [23].

Η αποαδενυλίωση μπορεί να επηρεάζεται από χαρακτηριστικά του mRNA. Η 5' καλύπτρα διεγείρει την ενεργότητα και την διαρκή εξωνουκλεοτιδική δράση δηλαδή την συνεχή αποαδενυλίωση από την PARN, ενώ δεν έχει επίδραση στην δράση άλλων αποαδενυλασών. Αυτή η ιδιαίτερη ιδιότητα της PARN οφείλεται στην ικανότητα πρόσδεσης του ενζύμου αυτού στην 5' καλύπτρα του mRNA μέσω μια ειδικής περιοχής πρόσδεσης. Σε κάποια mRNA η πολυ(A) ουρά μπορεί να προστατευθεί από τις αποαδενυλάσες μέσω ζευγαρώματος βάσεων. Για παράδειγμα το πυρηνικό RNA της PAN στο σάρκωμα Karosi, προκαλούμενο από ερπιτοϊό, αποτρέπει την αποαδενυλίωση του με ζευγάρωμα των βάσεων μεταξύ της πολυ(A) ουράς και μίας περιοχής πλούσιας σε ουριδίνη [25].

1.8 Ενζυμα και έλεγχος αποαδενυλίωσης

Η ρύθμιση ειδικών mRNA οφείλεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες που συχνά βρίσκονται στο 3' UTR και προάγουν την αποαδενυλίωση. Στις αλληλουχίες αυτές προσδένονται παράγοντες που στρατολογούν αποαδενυλάσες και διεγείρουν την αποαδενυλίωση. Διάφορες RNA προσδενόμενες πρωτεΐνες (CUG-BP, PUF και CPEB), στρατολογούν τις αποαδενυλάσες αλληλεπιδρώντας άμεσα με αυτές [26,27]. Ακόμα και η PABP μπορεί να ενεργοποιήσει την αποαδενυλίωση έλκοντας το σύμπλοκο Pan2-Pan3 στο mRNA. Στα θηλαστικά η PABP μπορεί να στρατολογήσει σύμπλοκα μελών των οικογενειών Pop2-Ccr4 μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που συσχετίζονται με TOB πρωτεΐνες [27]. Η συνδυαστική δράση των ρυθμιστών επεκτείνει την πολυπλοκότητα των διαδικασιών αποαδενυλίωσης. Πολλαπλοί καταστολείς είτε πρωτεΐνες είτε miRNAs, συχνά προσδένονται στο ίδιο mRNA 3' UTR. Για παράδειγμα, οι κατασταλτικές πρωτεΐνες του ζυμομύκητα Puf4 και Puf5 προσδένονται στο 3' UTR του HO mRNA και κάθε πρωτεΐνη επιστρατεύει τα σύμπλοκα Ccr4-Pop2 για να επιταχυνθεί η αποαδενυλίωση [28]. Επιπλέον σύμπλοκα που προσδένονται στο 3'-UTR μπορούν μέσω διαφορετικών υπομονάδων να προσελκύσουν αποαδενυλάσες.

Το υπόστρωμα των αποαδενυλασών, η πολυ(A) ουρά του mRNA είναι καλυμμένη με μόρια PABP που εμποδίζουν την πρόσβαση σε αυτήν. Η ρυθμιζόμενη αποδέσμευση της PABP από την πολυ(A) του mRNA ή η αλληλεπίδραση της PABP με μία αποαδενυλάση μπορεί να διεγείρει την αποαδενυλίωση [29]. Στον άνθρωπο υπάρχουν τουλάχιστον 6 μορφές της PABP, ενώ υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες που επίσης προσδένονται στη πολυ(A) ουρά (όπως η NAB2), για τις οποίες δεν είναι γνωστό εάν επηρεάζουν την αποαδενυλίωση. Οι ρυθμιστές είναι δυνατόν να μπλοκάρουν την αποαδενυλίωση με το να σταθεροποιούν σύμπλοκα PABP-mRNA. Το α-CP σύμπλοκο των RNA προσδενόμενων πρωτεϊνών σταθεροποιεί το mRNA της α-globin με το να προσδένεται στην PABP. Συγχρόνως άλλες πρωτεΐνες προσδέτες μπορούν να επηρεάζουν την αποαδενυλίωση. Η CBP80, μία υπομονάδα του πυρηνικού συμπλόκου πρόσδεσης στο 5' κάλυμμα προσδένεται και ανταγωνίζεται την δράση της PARN, πιθανόν περιορίζοντας την δράση της σε νεοσυντιθέμενα pre-mRNAs [30]. Επιπλέον ρυθμιστικές πρωτεΐνες μπορούν να δρουν μέσω της PABP για να διεγείρουν την αποαδενυλίωση του mRNA. Πρωτεΐνες συσχετιζόμενες με ελικάση όπως η RHAU μπορούν να διεγείρουν την αποαδενυλίωση αντικαθιστώντας την PABP από την πολυ(A) ουρά. Η TOB των θηλαστικών διεγείρει την αποαδενυλίωση με το να στρατολογεί μέλη της Ccr4-Pop2 οικογένειας μέσω

αλληλεπιδράσεων με την C-τελική περιοχή (non-RNA-binding) της PABP. Η TOB λειτουργεί ως γέφυρα συνδέοντας την PABP με σύμπλοκα αποαδενυλίωσης [31, 27].

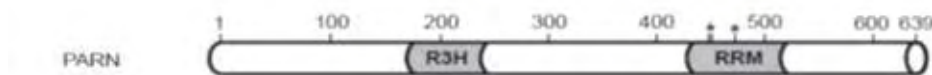
Πολλοί ρυθμιστές (όπως PUF, CPEB, KSRP, Smaug, TTP και miRNAs) στρατολογούν ειδικές αποαδενυλάσες και συμπράγοντες τους, που είτε αναστέλλουν την μετάφραση (όπως Dhh1, Maskin, CUP and 4EHP), είτε προάγουν την απομάκρυνση της καλύπτρας (όπως η DCP1 και DCP2) είτε αποικοδομούν ταχεία το mRNA (όπως το εξώσωμα και η εξωριβονουκλεάση -1 (XRN1).

Τα miRNAs δρουν με ποικίλο τρόπο πάνω στα μόρια mRNA. Μπορούν να καταστείλουν την μετάφραση ενός mRNA, να διεγείρουν την αποικοδόμηση του, και να προκαλέσουν αποαδενυλίωση [32]. Τα miRNAs αλληλεπιδρούν με την Argonauteπρωτεΐνη για να σχηματίσουν τα RNA-induced silencing complexes (RISCs) [33]. Αυτά τα σύμπλοκα διεγείρουν την αποαδενυλίωση του mRNA μέσω του Ccr4–Pop2–Not συμπλόκου, καταστέλλουν την μετάφραση μέσω ενός μηχανισμού αλληλεπίδρασης Argonaute - 5' - καλύπτρα και προάγουν την αφαίρεση της καλύπτρας του mRNA μέσω του συμπλόκου αφαίρεσης της καλύπτρας Dcp1–Dcp2 [32, 34]. Επιπλέον, συστατικά του RISC σχετίζονται με ελικάση RCK (p54), μία ορθόλογη της Dhh1 που απαιτείται για την καταστολή μέσω miRNA [32]. Πρόσφατη μελέτη αναδεικνύει τον μοναδικό ρόλο των αποαδενυλασών και των πολυ(A) ουρών στην γονιδιακή αποσιώπηση με miRNA όπου υποστηρίζεται η άποψη ότι όλοι οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αποσιώπηση ακόμα και αυτοί που δεν ξεκινούν με την αποαδενυλίωση απαιτούν την παρουσία πολυ(A) με σύμπλοκο αποαδενυλάσης [35].

1.9Η πολυ(A)-εξειδικευμένηριβονουκλεάση [poly(A)-specificribonuclease, PARN]

Η πολύ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN), όπου θα μελετήσουμε στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, είναι μία από τις καλύτερα χαρακτηριζόμενες αποαδενυλάσες στα θηλαστικά. Φαίνεται πως είναι παρούσα τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Ανήκει στην DNAQ-like υπερικογένεια των 3'-5' εξωνουκλεασών. Η DNAQ-like υπερικογένεια περιλαμβάνει μια ποικιλία από εξωνουκλεάσες, συμπεριλαμβανμένων τόσο DNases και RNases [40]. Η επιτυχής κλωνοποίηση της PARN στον άνθρωπο και στο *X. laevis* αποκάλυψε ότι αποτελείται από 639 (μοριακό βάρος 73,5 kDa) και 631 αμινοξέα (μοριακό βάρος 72,8kDa), αντίστοιχα. Το ένζυμο στον άνθρωπο απαντά σε δύο ισόμορφες, μία

πυρηνική 74 kDa και μία κυτταροπλασματική 54 kDa. Η τελευταία είναι πρωτεολυμένο παράγωγο της πρώτης από το οποίο απουσιάζει το εύκαμπτο καρβοξυτελικό άκρο. Η περιοχή αυτή ευθύνεται και για την μετακίνηση της πρωτεΐνης στον πυρήνα αφού περιέχει την NLS (*nuclear localization signal*) αλληλουχία. Είναι μέλος της τάξης DEDD μιας κατηγορίας εξωνουκλεασών που περιέχουν τα διατηρημένα κατάλοιπα Asp-Glu-Asp-Asp στην ενεργό της περιοχή [38]. Ακόμη, η PARN μπορεί να ταξινομηθεί ως μέλος της οικογένειας Caf1 ριβονουκλεασών, λόγω του τομέα νουκλεάσης [41]. Η PARN υπάρχει ως διμερές, αλληλεπιδρά με δισθενές μέταλλο-ión, κυρίως Mg²⁺, που αποικοδομεί αποκλειστικά πολυ(A) ουρές ευκαρυωτικών mRNA. Το Mg²⁺ παίζει σημαντικό ρόλο στη δομική σταθερότητα της PARN [39]. Είναι η μόνη αποαδενυλάση που έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά άμεσα κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης πολυ(A) τόσο με τη δομή της καλύπτρας m⁷-G και της πολυ(A) ουράς του mRNA [36]. Αυτή η αλληλεπίδραση αυξάνει τη λειτουργία του ενζύμου, αυξάνοντας το ποσοστό της αφαίρεσης πολυ(A). Παραδόξως, η PARN δεν εμπλέκεται αποκλειστικά σε ρύθμιση της λειτουργίας mRNA, καθώς συμμετέχει επίσης στην επεξεργασία ορισμένων μη κωδικοποιημένων RNAs, όπως τα μικρά πυρηνικά RNAs (snRNAs) και των μικρών RNAs στα σωμάτια Cajal (ScaRNAs) [37].

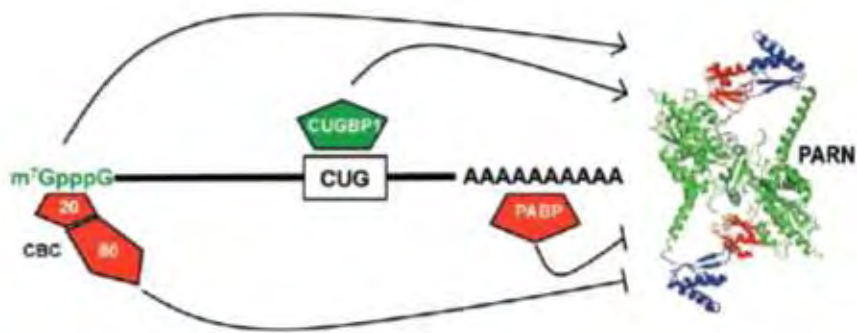


Εικόνα 8. Η PARN αποτελείται από RNA-δεσμευτικές περιοχές. Η NLS (*nuclear localization signal*) ευθύνεται και για την μετακίνηση της πρωτεΐνης στον πυρήνα [45].

Ανάλυση αλληλουχίας αποκαλύπτει ότι κάθε υπομονάδα περιέχει τρεις RNA-δεσμευτικές περιοχές, τον τομέα αναγνώρισης RNA (RRM), τον τομέα νουκλεάσης και τον τομέα R3H ο οποίος είναι μία πρωτεϊνική περιοχή όπου περιέχει ένα μη μεταβλητό κατάλοιπο αργινίνης και υψηλά διατηρημένα κατάλοιπα ιστιδίνης και ένα C-τερματικό τομέα (CTD)

(Εικόνα 8). Ο τομέας νουκλεάσης και ο τομέας RRM έχουν υψηλή προτίμηση στη σύνδεση με πολυ(A) και ο RMM έχει υψηλή σύνδεση με την καλύπτρα. Ο τομέας RRM προσδένεται με την καλύπτρα, στον άνθρωπο, μέσω του καταλοίπου τρυπτοφάνης W475 (NilssonNi et al., 2007). Το ελάχιστο μήκος υποστρώματος είναι τα δι- ή τρι- νουκλεοτίδια αδενοσίνης ανάλογα με το ποιο μεταλλικό ιόν βρίσκεται στο ενεργό κέντρο. Δεν ήταν σαφές γιατί η PARN απαιτεί τρεις περιοχές σύνδεσης και αν οι τρεις τομείς συμβάλουν στην αποτελεσματικότητα και στην καταλυτική δράση του ενζύμου. Σε πρόσφατη μελέτη κατασκεύασαν μια σειρά από μεταλλάγματα που στερούνται είτε τον έναν είτε δύο από τους τρεις τομείς RNA-σύνδεσης. Ο τομέας R3H έχει την ικανότητα να δεσμεύει διάφορα ολιγονουκλεοτίδια χωρίς προτίμηση, όταν έλειπε ο τομέας αυτός η PARN υπήρχε ως μονομερές και κατείχε την ιδιότητα της αποαδενυλίωσης. Άρα ο τομέας αυτός είναι απαραίτητος για τη δομή του ενζύμου. Η περιοχή RRM παίζει ρόλο στην αναγνώριση της καλύπτρας. Κρυσταλλικές δομές δείχνουν ότι η περιοχή αυτή συνδέεται με τη 7-μεθυλογουανοσίνη καλύπτρα μέσω ενός καταλοίπου τρυπτοφάνης [45].

Η πολυ(A) ουρά του mRNA συνδέεται στον πυρήνα με την πυρηνική πολυ(A)-δεσμευτική πρωτεΐνη 1 (PABPN1) ενώ στο κυτταρόπλασμα, η PABP1 αντικαθίσταται από την PABPC. Εκτός από αυτά τα δύο μεγάλα PABPs, έχουν εντοπιστεί και άλλα PABPs που συνδέονται με την πολυ(A), αυξάνοντας την ετερογένεια των συμπλόκων πολυ(A)/PABP [42]. Η σύνδεση της PABP με την πολυ(A) αναστέλλει τη δραστηριότητα της PARN (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Η σύνδεση της PABP αναστέλλει τη δραστηριότητα της PARN [42].

Πρόσφατα έχει δειχθεί πως η PARN μπορεί να συμμετέχει στον έλεγχο ενός υποσυνόλου mRNAs αντί για το μεγαλύτερο μέρος του mRNA πληθυσμού [43]. Επίσης,

φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη πρόωρη ανάπτυξη καθώς ίσως και σε ορισμένους καρκίνους. Πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι η έκφραση της PARN ήταν υψηλότερη 2,2 φορές σε οξεία λεμφαιοκυτταρική λευχαιμία (ALL) και 2 φορές σε οξεία μυελογενή λευχαιμία (AML) σε σύγκριση με άλλους ασθενείς [44].

1.10Φυλογενετική ανάλυση της PARN και ο ρόλος του C-τελικού άκρου.

Εκτενής φυλογενετική ανάλυση, βασισμένη στο σύνολο των διαθέσιμων γονιδιωμάτων, έδειξε μια ευρεία κατανομή για την PARN στα ευκαρυωτικά είδη, και αποκάλυψε δομικά σημαντικά αμινοξέα, τα οποία δυνητικά θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στη ρύθμιση του καταλυτικού μηχανισμού της PARN [46]. Συνολικά εντοπίστηκαν 32 ομόλογες πρωτεϊνικές αλληλουχίες της PARN στα γονιδιώματα των ειδών, οι οποίες αντιπροσωπεύουν διαφορετικές ταξινομικές ευκαρυωτικές ομάδες (σύμφωνα με την ταξινομική βάση δεδομένων του NCBI). Ομόλογα της PARN δεν βρέθηκαν στο αρθρόποδο *Drosophila melanogaster* και στο μύκητα *S. Cerevisiae*. Το καρβοξυτελικό άκρο της PARN περιέχει την περιοχή NLS η οποία ευθύνεται για την μετακίνηση της πρωτεΐνης στον πυρήνα. Επίσης έχειδειχθεί ότι η ανθρώπινη PARN αναστέλλεται από το σύμπλοκο CBC (Nuclear Cap Binding Complex) και συγκεκριμένα η υπομονάδα CBP80 (80-kDa) φαίνεται να αλληλεπιδρά με το καρβοξυτελικό άκρο της PARN και να προκαλεί αυτή την αναστολή. Δοκιμές που έγιναν πάνω στο μετάλλαγμα PARN (1-470) επιβεβαίωσαν τα ανωτέρω καθώς δεν παρατηρήθηκε αναστολή από το σύμπλοκο CBC [47]. Έτσι μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το καρβοξυτελικό άκρο της ανθρώπινης PARN παίζει ρυθμιστικό ρόλο στην λειτουργία του ενζύμου.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε δοκιμασία υπερέκφρασης και απομόνωσης ενός μεταλλάγματος της ανθρώπινης PARN, από το οποίο λείπουν τα κατάλοιπα 524-639. Δηλαδή απουσιάζει η εύκαμπτη καρβοξυτελική ουρά που φέρει την αλληλουχία NLS, αλλά εμπεριέχεται η RRM περιοχή. Επίσης έγινε μελέτη των κινητικών παραμέτρων του μεταλλάγματος και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά του ενζύμου αγρίου τύπου. Υπενθυμίζεται πως η ανθρώπινη PARN αποτελείται από 639 κατάλοιπα και μέχρι σήμερα έχει προσδιοριστεί η κρυσταλλική δομή της PARN 1-430. Η πλασμιδιακή κατασκευή pET-15b-PARN (1-523), που δημιουργήθηκε ως αποτέλεσμα του συγκεκριμένου πειράματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την έκφραση, απομόνωση και καθαρισμό μεγάλων ποσοτήτων της PARN (1-523), προκειμένου να αποτελέσουν το κατάλληλο υπόστρωμα για μελέτες προσδιορισμού της δομής της με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ και αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης της PARN.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

A) Χημικά

Ammonium Persulfate (APS) SIGMA

Ampicillin

Bovine Serum Albumin (BSA) New England Biolabs

Coomassie Brilliant Blue Fluka

Diethylpyrocarbonat (DEPC) Research Organics

Dithiothreitol (DTT) SERVA

EDTA Panreac

HCl Merck

HEPES SERVA

Imidazole

Isopropyl ThioGalactosyl (IPTG) Fermentas

KCl Merck

KH_2PO_4

KOH Merck

LB Agar Scharlau

LB Broth Scharlau

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ Panreac

Midori green

NaCl Panreac

NaHCO_3 Merck

NaOH Merck

Poly a

Phenylmethanesulfonylfluorid (PMSF) SERVA

SDS (Sodium dodecyl sulfate) SIGMA

TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) Research Organics

Tris acetic EDTA (TAE)
Tris base Merck
Triton
Αγαρόζη (Agarose) SeaKem
ΑιθανόληPanreac
Ακρυλαμίδα (Acrylamide) SIGMA
β-μερκαπτοαιθανόλη Riedel de Haen
Γλυκερόλη (glucerosol) Panreac
Δις-ακρυλαμίδιο (Bis-acrylamide) SIGMA
Ισοπροπανόλη (Isopropanole) Scharlau
Οξικόοξύ Merck
ΜεθανόληAppliChem
 Na_2HPO_4
 Na_2CO_3 Panreac
Γλυκίνη (Glycine) BioChemica
ΣκόνηγάλακτοςRegilait
Tween-20 BioChemica

Β) Βακτηριακά στελέχη

BL21 Gold, στελέχη του βακτηρίου Esherichia Coli

Γ) Θρεπτικά υλικά

LB Broth Scharlau

LB Agar Scharlau

Δ) Πρωτεΐνες και ένζυμα

PARN(1-523) από βακτηριακά στελέχη BL21Gold

BSA Fraction V Merck

Lysozyme

Ε) Υλικά χρωματογραφίας συγγένειας

HisTrap HP (Ni Sepharose) (GE Healthcare)

Ministart (0,22μm)(Sartorius stedim biotech)

ΣΤ) Υλικά διαπίδυσης

Μεμβράνη διαπίδυσης SIGMA

Ζ) Υλικά για το Western Blotting

Μεμβράνη PVDF

Χαρτί Whatman

1ο αντίσωμα: Antisome anti-PARN (1/1.000)

2ο αντίσωμα: anti-HPR Coupled ZNAAb CHEMLOON (1/10.000)

Developer

Fixer

Η) Αντιδραστήρια μοριακής βιολογίας

1kb dna ladder (generuler)

Dnase

Dnase buffer

3.2 Διαλύματα

A) Θρεπτικά υλικά

- Υγρό θρεπτικό μέσο (LB Broth) pH 7,2
- Στερεό θρεπτικό μέσο (LB Agar) pH 7,2

Β) Διαλύματα για απομόνωση πρωτεΐνης

- Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης (20mM HEPES pH 7,9, 0,5M KCL, 0,1% Triton X-100, PMSF 0,1mM, μερκαπτοαιθανόλη 2mM, λυσοζύμη)
- Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης (20mM HEPES pH 7,9, 0,5M KCL, 10% γλυκερόλη, 20mM Imidazole)
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης (20mM HEPES pH 7,9, 0,5M KCL, 10% γλυκερόλη, 500mM Imidazole)

Γ) Διαλύματα για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου

- Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου (10x)
 - Tris base 1,5%
 - Γλυκίνη 7,2% v/w
 - SDS 0,5%, pH 8,3
- Διαλύματα stock για πήκτωμα ακρυλαμίδιου:
 - Running Gel
 - 1,5 % Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS-HCL 1,5M, pH 8,8
 - SDS 10% v/w
 - TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)
 - 10 % APS
 - Ακρυλαμίδιο 30% v/w (ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο : 29/1) σε ddH2O
 - Stacking Gel
 - 1M Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS-HCL 0,5M, pH 6,8
 - SDS 10% v/w
 - TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)
 - 10% APS
 - Ακρυλαμίδιο 30% v/w (ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο : 29/1) σε ddH2O

Δ) Διαλύματα για βαφή του gel

- Βαφή πηκτής με Coomassie
- Διάλυμα χρώσης Coomassie Brilliant Blue G250 0,1% w/v, ισοπροπανόλη 33%, οξικό οξύ 2%
- Οξικό οξύ 10%

Ε) Διαλύματα για Westen Blotting

- Transfer Buffer 10x (25mM Tris, 192mM glycine, 0,1% SDS, 10% MetOH, ddH₂O)
- Blocking Buffer (100ml PBS, 5% γάλα, 0,1%Tween-20)
- Washing Buffer (PBS, 0,1 % Tween-20)
- Chemiluminescent HPR Substrate Reagent A και B (Genscript Corporation)

ΣΤ) Διαλύματα για την ενεργότητα της PARN

- Νερό ελεύθερο νουκλεασών (0,05% DEPC, O/N και αποστείρωση, αποθήκευση στο σκοτάδι)
- Διάλυμα αντίδρασης (1,5mM MgCl₂, 100mM KCl, 20mM HEPES-KOH, pH 7, 0,2mMEDTA, 10% γλυκερόλη)
- Διάλυμα κυανού του μεθυλενίου (0,0012% κυανό του μεθυλενίου, 0,1M MOPS-KOH pH 7,5, 2mMEDTA)
- Διάλυμα πολύ(A) 100μg/ml. Διάλυμα αποθήκευσης πολύ(A) (10mg/ml) αραιώνεται κατάλληλα σε διάλυμα αντίδρασης

3.3 Μέθοδοι

A) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation)

Βακτηριακά κύτταρα (συνήθως από stock γλυκερόλης) ενοφθαλμίζονται σε 3ml LB broth που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό. Ακολουθεί επώαση των καλλιιεργειών για 12-14h στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm). Η ακόλουθη διαδικασία πραγματοποιείται με βάση το πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *E. coli*, NucleoSpin Plasmid QuickPure:

1) Καλλιέργεια και συλλογή των βακτηριακών κυττάρων:

Μεταφέρονται 1,5ml από την καλλιέργεια *E. coli* που αναπτύχθηκε σε ένα σωλήνα και φυγοκεντρώνεται για 30s στις 11000 x g. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται αυτό το βήμα.

2) Λύση των κυττάρων:

Προστίθενται 250μl buffer A1 και επαναδιαλύεται το ίζημα με τη βοήθεια πιπέτας και έντονη ανάδευση στο vortex. Ακολουθεί προσθήκη 250μl buffer A2 και ανάμειξη αναποδογυρίζοντας ήπια μερικές φορές χωρίς τη χρήση του vortex. Το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά. Ακολούθως προστίθενται 300μl buffer A3 και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση αναποδογυρίζοντας μερικές φορές (6-8) αποφεύγοντας τη χρήση του vortex. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 11000 x g σε θερμοκρασία δωματίου.

3) Δέσμευση του DNA:

Τοποθετείται η στήλη NucleoSpin (Plasmid QuickPure σε ένα συλλεκτικό σωλήνα (collecting tube) των 2ml στην οποία φορτώνεται το υπερκείμενο που έχει προκύψει από τη φυγοκέντρηση του προηγούμενου βήματος. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11000 x g και απομάκρυνση του εκλούσματος.

4) Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης:

Επανατοποθετείται η στήλη στο συλλεκτικό σωλήνα και προστίθενται 450μl buffer AQ (με αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 11000 x g όπου και επιτυγχάνεται ξήρανση της μεμβράνης σιλικόνης. Τέλος, πραγματοποιείται απομάκρυνση του εκλούσματος και φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα.

5) Έκλουση του DNA:

Τοποθετείται η στήλη σε νέο σωλήνα και προστίθενται 50μl buffer AE. Στη συνέχεια, επώάζεται το δείγμα για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11000 x g.

B) Χημικός μετασχηματισμός δεκτικών BL21 Gold κυττάρων (transformation)

Σε 100μl επιδεκτικών κυττάρων γίνεται προσθήκη 1-2μl του πλασμιδίου Pet21b. Όπου περιέχει το γονίδιο της πρωτεΐνης PARN1-523. Στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση στον πάγο για 30min και ακολουθεί θερμικό σοκ στους 42 °C για 45 δευτερόλεπτα (sec). Έπειτα τα κύτταρα επώάζονται στον πάγο για 1-2 λεπτά (min) και εν συνεχεία προστίθενται 450μl LB broth στην καλλιέργεια. Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα στους 37⁰ C υπό ανάδευση (210 rpm). Τέλος, επιστρώνονται 50μl της μετασχηματισμένης καλλιέργειας σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB agar το οποίο περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη), ανάλογα με τα γονίδια ανθεκτικότητας που διαθέτει το εκάστοτε πλασμίδιο που χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό. Τέλος, πραγματοποιείται επώαση των τρυβλίων στους 37 °C για 12-14 ώρες. Μετά το πέρας της επώασης, εφόσον υπάρχουν διακριτές αποικίες, ενοφθαλμίζουμε σε 5ml LB Broth με 5 μl αντιβιοτικού (αμπικιλίνη) μία αποικία. Το επωάζουμε ο/η στους 37 °C και 210 rpm. Δημιουργούμε stock από την συγκεκριμένη καλλιέργεια χρησιμοποιώντας 700μl της καλλιέργειας και 200μl γλυκερόλης αποστειρωμένης (αποθήκευση στους -80 °C).

Γ) Δοκιμασία υπερέκφρασης της PARN(1-523)

Δημιουργία μικρών καλλιιεργειών

Σε ένα αποστειρωμένο φάλλον προστίθεται 5ml LB Broth και 5μl του αντιβιοτικού αμπικιλίνη. Με το tip της πιπέτας παραλαμβάνονται από το stock κυττάρων λίγα και ενοφθαλμίζονται στο φάλλον. Τοποθετούνται για επώαση ο/η στους 37 °C και 210 rpm.

Δημιουργία μεγάλων καλλιιεργειών

Σε 3εις αποστειρωμένες φιάλες των 2 λίτρων με 750ml LB Broth και 750μl του αντιβιοτικού αμπικιλίνη εμβολιάζονται στην κάθε μία 750μl από την μικρή καλλιέργεια. Πριν πραγματοποιηθεί ο εμβολιασμός φυλάσσεται 1ml LB Broth, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί ως τυφλό στη διαδικασία της φασματοφωτομέτρησης. Ακολούθως, γίνεται επώαση των 2 κωνικών φιαλών στους 37 °C και στα 210 rpm, μέχρι OD600 ~ 0,5-0,7. Στην πειραματική διεργασία που περιγράφεται στη διπλωματική αυτή, η επώαση διήρκεσε 7-8 ώρες, καθώς μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος η OD600 πήρε τις απαιτούμενες τιμές στις δύο κωνικές φιάλες. Μόλις φτάσει στο επιθυμητό OD600 προστίθενται 750μl IPTG στη κάθε μία κωνική φιάλη. Επωάζονται για 4 ώρες στους 37⁰ C και 210 rpm. Το σύνολο της καλλιέργειας φυγοκεντρείται στους 4 °C, στα 4000 rpm για 30 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται καθώς στο ίζημα περιέχονται τα κύτταρα. Αποθηκεύονται στους -80 °C. Να τονιστεί, ότι τόσο η παρασκευή των μικρών και μεγάλων καλλιιεργειών όσο και η φασματοφωτομέτρηση, γίνονται σε στείρες συνθήκες και παρουσία αυτόκαυστου. Χρησιμοποιούνται αποστειρωμένα υλικά και σκεύη, και το πείραμα διεξάγεται σε πάγκους οι οποίοι έχουν καθαριστεί με αιθανόλη.

Δ) Απομόνωση της PARN

Ομογενοποίηση των κυττάρων

Το ίζημα των κυττάρων, από κάθε μια καλλιέργεια ξεχωριστά, διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης (περίπου 1ml σε κάθε ένα από τα τέσσερα falcon). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η διαδικασία του σπασίματος των κυττάρων με υπέρηχους (sonication) μέσα

σε πάγο. Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στις 12.000rpm, για 60min στους 4°C. Διαχωρίζεται το υπερκείμενο από το ίζημα και ακολουθεί η διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης η οποία βρίσκεται στο υπερκείμενο.

Καθαρισμός με χρωματογραφία συγγένειας (ÄKTA - GEHealthcare)

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι η HisTrap HP Ni Sepharose καθώς η πρωτεΐνη δεσμεύεται στη ρητίνη μέσω σύνδεσης των ιστιδινών που περιέχει το αμινοτελικό άκρο με τα μόρια του νικελίου. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) για την απομόνωση. Η στήλη μπορεί και δέχεται πίεση μέχρι 0,8MPa. Τα διαλύματα εξισορρόπησης και έκλουσης έχουν περαστεί από φίλτρο και απαερωθεί πριν χρησιμοποιηθούν. Αναλυτικά, καθαρίσαμε τη στήλη Ni Sepharose και την ÄKTA με αιθανόλη, μετά περάστηκε το διάλυμα εξισορρόπησης για περίπου 10 λεπτά με flow 1,00ml/min ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεση της PARN 1-523. Το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε για την έκλυση της πρωτεΐνης. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω σταδιακής αύξησης της ιονικής ισχύος. Το flow που πραγματοποιήθηκε ήταν 1ml/min. Όσο αυξάνεται η ιονική ισχύς, απομακρύνονται πρωτεΐνες από τη στήλη ανάλογα με την ισχύ πρόσδεσης τους σε αυτή. Επομένως, αρχικά θα παρατηρηθεί έκλυση των ασθενώς προσδεδεμένων πρωτεϊνών και στη συνέχεια εκλούνται οι ισχυρότερα προσδεδεμένες. Τα κλάσματα συλλέγονται ανά 1ml. Επομένως, μόλις η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης στη στήλη φτάσει το 60%, θα εκλουθεί η ισχυρότερα προσδεδεμένη σε αυτή πρωτεΐνη, η PARN 1-523. Τα κλάσματα στα οποία βρίσκεται η PARN(1-523) έχουν στο διάγραμμα οπτικής απορρόφησης την μεγαλύτερη OD στα 1070nm. Στο σημείο αυτό φορτώσαμε τα κλάσματα. Τα κλάσματα αυτά φυλάσσονται στο ψυγείο προκειμένου να υποβληθούν σε έλεγχο καθαρότητας στο επόμενο στάδιο του πειράματος.

Πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης

Η μέθοδος Bradford είναι μια απλή διαδικασία για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε ένα διάλυμα. Η τεχνική βασίζεται στην πρόσδεση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G250 στις πρωτεΐνες. Η χρωστική συναντάται σε τρεις μορφές: κατιονική (κόκκινη), ουδέτερη (πράσινη) και ανιονική (μπλε). Όταν η χρωστική προσδένεται στην

πρωτεΐνη μετατρέπεται στην σταθερή αποπρωτονιωμένη μορφή ($A_{max}=595nm$) η οποία ανιχνεύεται με τη χρήση ενός φασματοφωτομέτρου.

Σε κάθε πρωτεϊνική ανάλυση η ιδανικότερη πρωτεΐνη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μαρτυρας είναι ένα εξευγενισμένο παρασκεύασμα της πρωτεΐνης που αναλύεται. Σε περίπτωση που δεν μπορεί να επιτευχθεί αυτό, χρησιμοποιούνται παρεμφερείς μέθοδοι με συνηθέστερη την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης με χρήση BSA (Bovine Serum Albumin).

Παρασκευάστηκε stock διάλυμα BSA 10mg/ml. Από αυτό φτιάχτηκαν διαλύματα συγκέντρωσης από 0 μέχρι 2,00mg/ml (0, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2). Από κάθε δείγμα παραλαμβάνουμε 20μl και προσθέτουμε 1 ml Bradford, φυλάσσονται στο σκοτάδι για 15 λεπτά. Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάστηκε μετρώντας τις απορροφήσεις των διαλυμάτων φωτομετρικά στα 595nm.

Προκύπτει μια γραμμική σχέση με εξίσωση:

$$A = 0,9899 \times C + 0,0289$$

Με την συγκεκριμένη εξίσωση υπολογίστηκε η ολική συγκέντρωση πρωτεϊνών των δειγμάτων στα διάφορα στάδια της απομόνωσης.

Ε) Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμίδιου

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου, η οποία αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτές, την πηκτή διχωρμού (separating gel) και την πηκτή συγκέντρωσης (stacking gel). (Πίνακας 1 και Πίνακας 2 αντίστοιχα)

Αντιδραστήρια	Όγκος
Ακρυλαμίδιο 30%	2,5 ml
Tris-HCl 1,5 % (pH 8,8)	2,5ml
SDS 10%	0,1ml
TEMED	8μl
APS 10%	100μl
ddH ₂ O	4,8

Πίνακας 1: Σύσταση πηκτής διαχωρισμού 7,5%

Πίνακας 2: Σύσταση πηκτής συγκέντρωσης 5%

Αντιδραστήρια	Όγκος
Ακρυλαμίδιο 30%	850μl
Tris-HCl 1 M (pH 6,8)	625μl
SDS 10%	50μl
TEMED	5μl
APS 10%	50μl
ddH ₂ O	3,4ml

Το APS και το TEMED προστίθενται στο τέλος, καθώς είναι υπεύθυνα για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου. Ακολουθεί, αφαίρεση της πηκτής συγκέντρωσης και χρώση της πηκτής διαχωρισμού με το διάλυμα χρωματισμού (stain solution).

Η πηκτή συγκέντρωσης έχει μικρότερη πυκνότητα από το πήκτωμα διαχωρισμού και συγκεντρώνει τη ποσότητα των δειγμάτων που έχουμε φορτώσει στα πηγάδια, τα οποία όταν εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού, διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Αρχικά η πηκτή διαχωρισμού τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται από πάνω της μικρή ποσότητα ισοπροπανόλης για την ευθυγράμμιση της επιφάνειας της πηκτής. Αφού πήξει, αφαιρείται η ισοπροπανόλη και τοποθετείται στη συσκευή η πηκτή συγκέντρωσης ακριβώς πάνω από την πηκτή διαχωρισμού, η οποία αφήνεται να πήξει. Η προετοιμασία των δειγμάτων πριν φορτωθούν στην πηκτή περιλαμβάνει την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού (4x) και τη μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η μετουσίωση επιτυγχάνεται με θέρμανση των δειγμάτων στους 98°C, για 5 λεπτά, έτσι ώστε να γίνει ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος και όχι με βάση το φορτίο τους, το οποίο είναι ενιαίο αρνητικό, εξαιτίας του SDS. Ακολούθως, αφού εξασφαλιστεί ότι η πηκτή είναι έτοιμη, φορτώνονται τα δείγματα, καθώς και οι μάρτυρες μοριακού βάρους, στις ειδικές υποδοχές της πηκτής και προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tris, γλυκίνη, SDS), έτσι ώστε να έρχεται σε επαφή με την πηκτή. Τέλος, συνδέονται τα ηλεκτρόδια με την συσκευή τροφοδότησης και εφαρμόζεται τάση 100V, μέχρι τα δείγματα να διανύσουν την πηκτή συγκέντρωσης, ενώ μόλις φτάσουν στη πηκτή διαχωρισμού η τάση αυξάνεται στα 200V.

Χρώση πηκτώματος ακρυλαμιδίου με Coomassie

- Τοποθετείται το πήκτωμα σε ποτήρι ζέσεως και προστίθεται οξικό οξύ 10%
- Βράσιμο στο φούρνο μικροκυμάτων και μεταφορά σε νέο ποτήρι ζέσεως, όπου προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης (Coomassie Brilliant Blue G250)
- Βράσιμο στο φούρνο μικροκυμάτων και έπειτα ήπια ανάδευση για 5'
- Ξεπλένεται με νερό το πήκτωμα και τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως με οξικό οξύ 10%
- Βράσιμο στο φούρνο μικροκυμάτων
- Τοποθετείται σε νέο ποτήρι ζέσεως με οξικό οξύ 10%
- Ήπια ανάδευση

ΣΤ) Συμπύκνωση και Διαπίδυση

Το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 3000g, στους 4 °C ανά 3 λεπτά ώστε να συμπηκνωθεί με φίλτράκι Vivaspin 4 santorius με cut off 10 μέχρι τον επιθυμητό όγκο. Ένα κομμάτι μεμβράνης διαπίδυσης βράζετε σε υψηλή θερμοκρασία σε 2% w/v NaHCO₃ για 25 λεπτά και ξεπλένεται με αποστειρωμένο νερό. Σφραγίζεται η μεμβράνη από τη μία πλευρά με έναν κόμπο και ένα πιαστράκι και στη συνέχεια μεταφέρονται με την πιπέτα τα κλάσματα από την στήλη στην μεμβράνη. Η μεμβράνη σφραγίζεται και από την άλλη πλευρά. Έπειτα αυτή στηρίζεται στο πάνω μέρος ποτηριού ζέσεως των 500ml, το οποίο περιέχει διάλυμα αντίδρασης χωρίς DTT , έτσι ώστε το τμήμα της μεμβράνης που περιέχει τα δείγματα να βρίσκεται μέσα στο διάλυμα. Το ποτήρι ζέσεως τοποθετείται σε συσκευή μαγνητικής ανάδευσης με ένα μαγνήτη έτσι ώστε να αναδεύεται το διάλυμα στους 4 °C ο/ν. Την επομένη το διάλυμα μοιράζεται σε μικροσωλήνες φυγοκέντρησης (eppendorf tubes των 1,5ml) και αποθηκεύονται με αποστειρωμένη γλυκερόλη στους -80 °C .

Z) Μέτρηση της ενεργότητας της PARN με κυανό του μεθυλενίου

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος στηρίζεται στη μείωση της διαφοράς απορρόφησης (ΔA) του πολυ(A) στα 662nm όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή του [48,49]. Σύμφωνα με την αρχή αυτή και με βάση την πρότυπη καμπύλη γίνεται η μέτρηση της συγκέντρωσης σε μία αντίδραση των 100μl, με προσθήκη 900μl διαλύματος κυανού του μεθυλενίου. Το τελευταίο περιέχει κυανό του μεθυλενίου το οποίο προσδένεται στο πολυμερές πολυ(A) και EDTA σε συγκέντρωση 2mM το οποίο δεσμεύει τα ιόντα μαγνησίου. Τα ιόντα μαγνησίου είναι απαραίτητα για την λειτουργία του ενζύμου και έτσι το EDTA δεσμεύοντας τα ιόντα σταματάει την αντίδραση. Μείωση της συγκέντρωσης του πολυ(A), που οφείλεται σε ενζυμική δράση έχει ως συνέπεια την αύξηση της απορρόφησης. Έτσι για την μέτρηση της ενεργότητας προστίθεται ίδια ποσότητα πολυ(A) στο τυφλό και στην αντίδραση, όπου η τιμή της απορρόφησης, μετά από συγκεκριμένο χρονικό διάστημα στην αντίδραση, είναι ευθέως ανάλογη της ποσότητας πολυ(A) που αποικοδομήθηκε.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης πολυ(A)

Τα δείγματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης ετοιμάστηκαν σύμφωνα με τον πίνακα 3. Μετά την προσθήκη του διαλύματος κυανού του μεθυλενίου τα δείγματα επωάστηκαν για 15 λεπτά στους 30o C στο σκοτάδι και η φωτομέτρηση έγινε στα 662nm. Το φωτόμετρο μηδενίστηκε με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυ(A) (10μg/ml τελική συγκέντρωση). Υπολογίστηκε η διαφορά απορρόφησης (ΔA) θέτοντας το τυφλό ως 0. Από την πρότυπη καμπύλη προκύπτει η εξίσωση από την οποία μπορεί να υπολογιστεί η ποσότητα πολυ(A) που υδρολύεται κατά τις ενζυμικές αντιδράσεις.

Πίνακας 3: Πρότυπη καμπύλη πολυ(Α)

Τελική συγκέντρωση πολυ(Α) (10μg/ml)	1	3	5	6	7
Πολυ(Α) 100μg/ml (μl)	10	30	50	60	70
Διάλυμα αντίδρασης (μl)	90	70	50	40	30
Διάλυμα κυανού του μεθυλενίου (μl)	900	900	900	900	900

Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 30ο C. Για να υπολογιστεί ο βέλτιστος χρόνος αντίδρασης, πραγματοποιούνται πειράματα ενζυμικής δράσης στη βέλτιστη σταθερή συγκέντρωση υποστρώματος Km=30μg/ml, και σε καθορισμένους χρόνους σταματάει η αντίδραση με την προσθήκη 900μl ρυθμιστικού διαλύματος κυανού του μεθυλενίου και τα δείγματα φωτομετρούνται στα 662nm.

Η)Western Blotting

Η μέθοδος Western Blotting βασίζεται σε ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό μίγματος πρωτεϊνών και εν συνεχεία μεταφορά τους στην επιφάνεια μιας μεμβράνης PVDF και επώαση με ειδικό αντίσωμα για την υπό μελέτη πρωτεΐνη. Η τεχνική αρχίζει με την προετοιμασία του separating gel και την τοποθέτησή του στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Ακολουθεί η παρασκευή του stacking gel και η προετοιμασία των δειγμάτων. Ακολουθεί το φόρτωμα των δειγμάτων στα κανάλια του gel, γεμίζεται η δεξαμενή με Running Buffer και ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων για 45min στα 150Volts. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η μεμβράνη PVDF ενεργοποιείται σε μεθανόλη 100% για περίπου 2 λεπτά. Ακολουθεί η μεταφορά των διαχωρισμένων από την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών στη μεμβράνη PVDF. Τοποθετούνται 3 χαρτιά Whatman εμποτισμένα με Transfer Buffer στο κάτω ηλεκτρόδιο, εν συνεχεία τοποθετείται η μεμβράνη, το gel και άλλα 3 χαρτιά Whatman, με προσοχή ώστε να μην

εγκλωβιστεί αέρας στο σχηματιζόμενο «sandwich». Εφαρμόζεται τάση 150mA για 90min. Μετά το πέρας της μεταφοράς, αφαιρούνται οι μεμβράνες από το «sandwich» και πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου βάφεται με Coomassie για να δούμε αν πραγματοποιήθηκε σωστά η μεταφορά των πρωτεϊνών στην PVDF μεμβράνη. Εν συνεχεία η μεμβράνη PVDF εμβαπτίζεται με Blocking Buffer για 1 ώρα υπό ανάδευση. Αφαιρούμε το Blocking Buffer και προσθέτουμε το 1ο αντίσωμα (antisome anti-PARN), το αφήνουμε στους 4 οC υπό ανάδευση ο/η. Αφαιρώ το 1ο αντίσωμα και πραγματοποιώ 5 πλύσεις των 15 λεπτών με Washing Buffer. Αφαιρώ το Washing Buffer και προσθέτω το 2ο αντίσωμα για 1 ώρα υπό ανάδευση. Αφαιρώ το 2ο αντίσωμα και πραγματοποιώ 6 πλύσεις των 15 λεπτών με το Washing Buffer και φέρεται το διάλυμα 1:1 ECL από τους 4 ο C σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά και την τελευταία πλύση και αφού έχει παρασκευαστεί το διάλυμα ECL, η μεμβράνη PVDF στραγγίζεται και φέρεται σε ένα κομμάτι διαφανούς μεμβράνης. Προστίθεται όσο ECL απαιτείται για να καλυφθεί όλη η επιφάνεια της μεμβράνης και αναμένεται 3 λεπτά στο σκοτάδι. Η μεμβράνη στραγγίζεται και μεταφέρεται face down σε ένα δεύτερο κομμάτι διαφανούς μεμβράνης. Στη συνέχεια μεταφέρονται στην κασετίνα του film, όπου στερεώνονται. Γίνεται εμφάνιση της μεμβράνης PVDF με ειδικό πρόγραμμα στο μηχάνημα εμφάνισης.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A) Απομόνωση πλασμιδίου και μετασχηματισμός βακτηρίων.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απομόνωση της πλασμιδιακής κατασκευής Pet15b-PARN(1-523) από κύτταρα Dh5a σύμφωνα με το πρωτόκολο της μεθόδου mini preparation. Ακολούθησε

μετασχηματισμός βακτηριακών στελεχών BL21 (Gold) με το πλασμίδιο αυτό και δημιουργία stock γλυκερόλης τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -80°C .

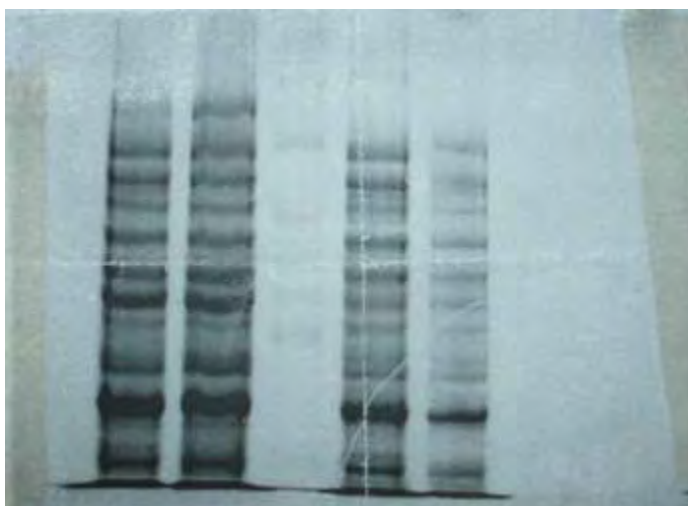
B) Δοκισία υπερέκφρασης της PARN(1-523) σε διάφορες συνθήκες (Expression profile).

Σε να αποστειρωμένο falcon προστέθηκαν 5 ml LB broth (αποστειρωμένο) και 5ml αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Με το tip της πιπέτας λήφθηκαν (σε ασηπτικές συνθήκες) κύτταρα από το glycerol stock και τα τοποθετήθηκαν στο falcon. Η καλλιέργεια αυτή επώαστηκε ο/η στους 37°C και 210 rpm. Σε 4εις αποστειρωμένες φιάλες των 100ml προστέθηκαν από 30 ml LB Broth και 30ml του αντιβιοτικού αμπικιλίνη (από stock 100μg/ml). Στη συνέχεια εμβολιάστηκαν, στην κάθε μία, 300ml από την μικρή καλλιέργεια ενώ 1 ml LB broth φυλλάχθηκε για να χρησιμοποιηθεί ως τυφλό στη διαδικασία της φασματοφωτομέτρησης. Στη συνέχεια, οι 4εις φιάσκες επώαστηκαν για 3εις ώρες στους 37°C και 210 rpm και η απορρόφησή τους έφτασε στο 0,584 τιμή η οποία αντιστοιχεί στην εκθετική φάση της καλλιέργειας. Ακολούθως έγινε αρίθμηση των 4ρων φιαλών (1-4). Στις φιάλες προστέθηκε IPTG σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Αριθμός Φιάλης	1	2	3	4
Συγκέντρωση IPTG mM	1	0,1	1	0,1

Στη συνέχεια, οι φιάλες με τον αριθμό 1 και 2 επώαστηκαν στους 37°C και 210 rpm για 4εις ώρες. Οι φιάλες με τον αριθμο 3 και 4 επώαστηκαν στους 4°C και 210 rpm O/N. Μετά το πέρας των τεσσάρων ωρών, οι καλλιέργειες των φιαλών 1 και 2, φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά (min) στις 4000 rpm και στους 4°C , μέσα σε falcon με την αρίθμηση 1 και 2 αντίστοιχα. Τα pellet των κυττάρων που προέκυψαν μετά τη φυγοκέντρωση τοποθετήθηκαν στους -80°C . Ύστερα από την O/N επώαση των φιαλών 3 και 4, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση για το

περιεχόμενό τους στις ίδιες συνθήκες (4000 rpm, 4 °C, 15min) και επίσης τα pellet φυλλάχθηκαν στους -80 °C σε falcon με την αρίθμηση 3 και 4 αντίστοιχα. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύθηκε με την προσθήκη 4ml ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης (1 ml σε κάθε falcon με ίζημα κυττάρων 1-4) και ακολούθησε σπάσιμο των κυττάρων με τη χρήση υπερήχων. Το ομογενοποίημα του κάθε falcon μεταφέρθηκε σε σωλήνα φυγοκέντρωσης με τον αντίστοιχο αριθμό και φυγοκεντρήθηκε στις 14000 rpm για 15 min. Στη συνέχεια το υπερκείμενο από κάθε σωλήνα συλλέχθηκε και πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου 7,5% (SDS-PAGE) (εικόνα 10).



Εικόνα 10: Φωτογραφία του gel μετά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου 7,5% (SDS-PAGE)

Για την επανάληψη της διαδικασίας έτοιμάστηκαν 4 νέα δείγματα από το εκχύλισμα κυττάρων και ηλεκτροφορήθηκαν σε νέο πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου 7,5% (SDS-PAGE). Στο πήκτωμα αυτό εφαρμόστηκε η τεχνική western blotting (εικόνα 11).



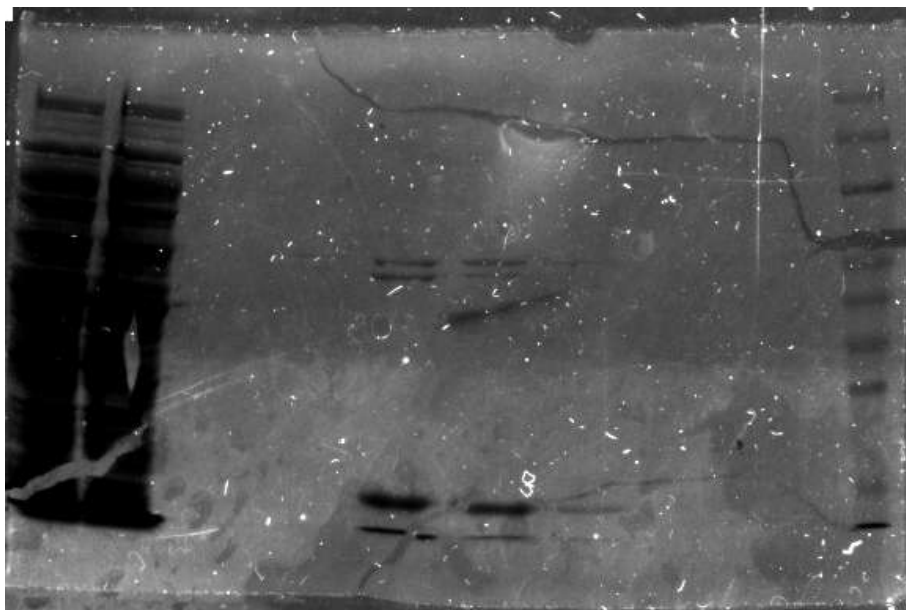
Εικόνα 11: Φωτογραφία του film μετά απόwesternblotting

Γ) Επαγωγή υπερέκφρασης PARN(1-523) και μελέτη κινητικών παραμέτρων

Μετά την O/N καλλιέργεια BL21Gold κυττάρων με την επιθυμητή μετάλλαξη (PARN 1-523) εμβολιάστηκε μέρος αυτής σε δύο φιάλες με 750 ml LB Broth και 750 μl αντιβιοτικού αμπικιλίνη η κάθε μία. Ακολούθησε επώαση στους 37 °C και 210 rpm για 6 ώρες (OD 0,55). Στη συνέχεια επάχθηκε η υπερέκφραση της PARN(1-523) με τη προσθήκη 750 μl IPTG από stock 1M. Ακολούθησε επώαση στους 37°C και 210 rpm για 4εις ώρες και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε το σύνολο της καλλιέργειας στις 5000 rpm και 4°C για 30min. Το ίζημα των κυττάρων φυλάχθηκε στους -80°C. Στο στάδιο αυτό προετοιμάστηκαν τα διαλύματα που εισάγονται στη στήλη (ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης και ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης) και ακολούθησε σπάσιμο των κυττάρων με τη προσθήκη 6ml ρυθμιστικού διαλύματος

εκχύλισης και χρήση υπερήχων. Στη συνέχεια το ομογενοποίημα των κυττάρων φυγοκεντρήθηκε στις 11000 rpm και στους 4 °C για 40min.

Ακολούθησε μετάγγιση του υπερκείμενου σε ένα αποστειρωμένο falcon και φιλτραρίστηκε με φίλτρο 0,45mm. Η μέτρηση της ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης στο διάλυμα έγινε με τη μέθοδο Bradford. Συμφωνα με τα αποτελέσματα της Bradford βρέθηκε ότι η συγκέντρωση της ολική πρωτεΐνης ήταν 0,21mg/ml. Η απομόνωση της PARN(1-523) έγινε με χρωματογραφία συγγένειας (HisTrap Ni Sepharose). Συλλέχθηκαν τα κλάσματα έκπλυσης και τα κλάσματα έκλουσης. Στη συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 7,5% (SDS-PAGE) των δειγμάτων που είχαν το μεγαλύτερο OD αυτά δηλαδή που ενδέχεται να έχουν την πρωτεΐνη μας. Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης φαίνεται στην εικόνα 12.



Εικόνα 12: Το gel ακρυλαμιδίου στο οποίο ηλεκτροφορήθηκαν τα κλάσματα που προέκυψαν από τον διαχωρισμό της πρωτεΐνης.

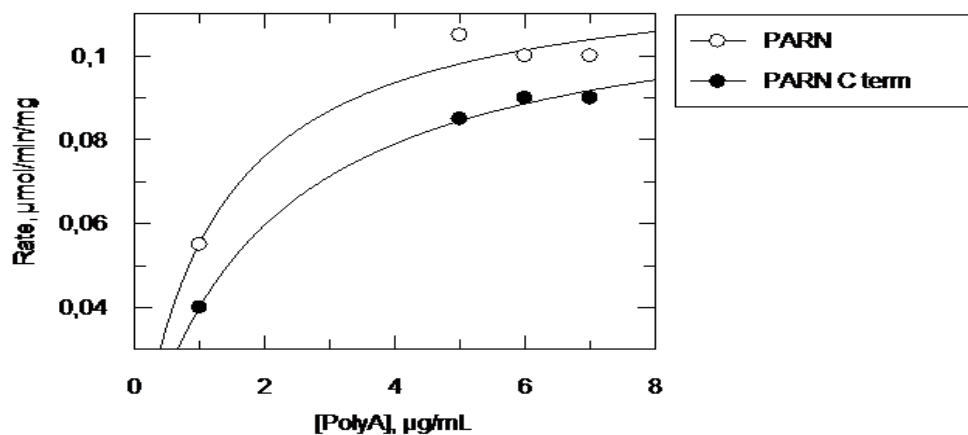
Τα εμπλουτισμένα δείγματα όπου περιέχουν την πρωτεΐνη μας καθαρή συμπυκνώθηκαν και μεταφέρθηκαν για διαπίδυση για 12 ώρες σε διάλυμα αντίδρασης για την απομάκρυνση του ιμιδαζολίου. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση στο διάλυμα που προέκυψε μετά τη διαπίδυση. Στο σημείο αυτό πραγματοποιήθηκε Bradford για τη

συμπυκνωμένη πρωτεΐνη. Το αποτέλεσμα ήταν 5,766mg/ml. Στη συνέχεια η πρωτεΐνη αποθηκεύτηκε στους -80 °C σε γλυκερόλη με νέα τελική συγκέντρωση 3,76 mg/ml.

Μέτρηση της ενεργότητας της PARN(1-523) με κυανό του μεθυλενίου

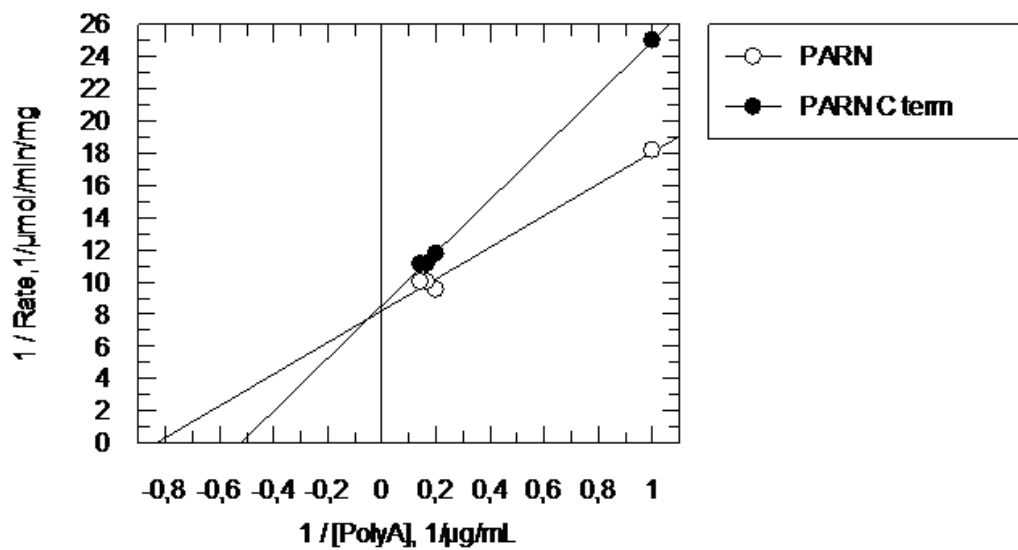
Για την παρατήρηση της επίδρασης της μετάλλαξης στη δραστικότητα του ενζύμου, πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις στους 30°C και σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος (1,3,5,6,7μg πολυ(A)), μία με το ένζυμο αγρίου τύπου και μία για το μεταλλαγμένο ένζυμο. Οι ποσότητες των ενζύμων υπολογίστηκαν για το 1μg υποστρώματος (πολυ(A)) και μαζί να ισχύει η συνθήκη $[E]/[S]=1/5$. Κάθε φορά που αυξανόταν η συγκέντρωση του υποστρώματος μειωνόταν η ποσότητα του διαλύματος αντίδρασης που προσθέτονταν, ώστε να έχουμε τελικό όγκο αντίδρασης 1ml (η ποσότητα του κυανού του μεθυλενίου παραμένει σταθερή στα 900μl). Τα διαλύματα παρέμειναν στους 30°C για 15 λεπτά πριν την προσθήκη του Methylene blue και στη συνέχεια φωτομετρήθηκαν στα 662nm σε τέσσερις διαφορετικούς χρόνους (0, 5, 10 και 30 λεπτά). Στις εικόνες που ακολουθούν (Εικόνα 12 και Εικόνα 13) παρουσιάζονται τα διαγράμματα των αποτελεσμάτων από δύο επαναληπτικά πειράματα. Για κάθε επανάληψη, παρατίθενται ένα διάγραμμα απορρόφησης του ενσωματωμένου κυανού του μεθυλενίου στο πολυ(A) στα 662nm προς το χρόνο αντίδρασης. Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα, η απορρόφηση της PARN(1-523) είναι μειωμένη σε σχέση με αυτή της PARN καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης. Ακόμη, διαπιστώνουμε από την Εικόνα 19 πως η ενεργότητα της PARN(1-523) είναι μικρότερη από της PARN καθώς η απορρόφηση της PARN είναι μικρότερη άρα καταναλώνει περισσότερο υπόστρωμα. Επίσης, παρατηρείται μείωση της απορρόφησης του κυανού του μεθυλενίου καθώς προχωρά η αντίδραση και από τα δύο ένζυμα σύμφωνα με το ίδιο πρότυπο, γεγονός που συμβαδίζει με τις πληροφορίες που υπάρχουν ως τώρα για τον τρόπο δράσης της PARN. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκαν οι κινητικές σταθερές K_M και V_{max} της PARN(1-523) (Πίνακας 6). Η σύγκριση με τις αντίστοιχες σταθερές της αγρίου τύπου PARN δεν έδειξε σημαντικές διαφορές. Η μικρή μείωση στην K_M δείχνει πως η μετάλλαξη πράγματι επιδρά στην πρόσδεση του υποστρώματος στο δραστικό κέντρο, ενώ ο ρυθμός της αντίδρασης δεν άλλαξε σημαντικά.

Καμπύλη Michaelis-Menten



Εικόνα 13: Η καμπύλη η Michaelis-Menten όπως προέκυψε από τη μελέτη κινητικών με κυανό του μεθυλενίου.

Καμπύλη Lineweaver Burk



Εικόνα 14: Η καμπύλη Lineweaver Burk για την PARNwt και την PARN1-523.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Βιοχημικές μελέτες διαμόρφωσαν την υπόθεση ότι το καρβοξυτελικό άκρο της ανθρώπινης PARN παίζει ρόλο στον έλεγχο της ενεργότητας του ενζύμου. Συγκεκριμένα έχειδειχθεί ότι η ανθρώπινη PARN αναστέλλεται από το σύμπλοκο CBC (Nuclear Cap Binding Complex) και συγκεκριμένα η υπομονάδα CBP80 (80-kDa) φαίνεται να αλληλεπιδρά με το καρβοξυτελικό άκρο της PARN και να προκαλεί αυτή την αναστολή. Δοκιμές που έγιναν πάνω στο μετάλλαγμα PARN (1-470) επιβεβαίωσαν τα ανωτέρω καθώς δεν παρατηρήθηκε αναστολή από το σύμπλοκο CBC [47]. Ένα ερώτημα που προκύπτει από τα αποτελέσματα αυτά είναι το αν το καρβοξυτελικό άκρο παίζει ρόλο μόνο στην ρύθμιση της ενεργότητας του ενζύμου ή παίζει και ρόλο στον καταλυτικό μηχανισμό της αποσύνθεσης της poly(A) ουράς. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πειράματος συμπεραίνουμε ότι υπάρχει μια συμβολή του καρβοξυτελικού άκρου στη δράση του ενζύμου καθώς το μετάλλαγμα PARN(1-523) εμφανίζει μειωμένη ενεργότητα σε σχέση με το αγρίου τύπου ένζυμο. Μια πιθανή εξήγηση θα ήταν ότι το μετάλλαγμα δεν προσδένεται ικανοποιητικά στο RNA επηρεάζοντας τη δραστηριότητά του μειώνοντας την επεξεργαστική του ιδιότητα.

Ένας άλλος ρόλος του καρβοξυτελικού άκρου της PARN προκύπτει από τα παρακάτω. Όπως αναφέρθηκε, η κλωνοποίηση της PARN στον άνθρωπο και στο *X. laevis* αποκάλυψε ότι αποτελείται από 639 (μοριακό βάρος 73,5 kDa) και 631 αμινοξέα (μοριακό βάρος 72,8kDa), αντίστοιχα. Το ένζυμο στον άνθρωπο απαντά σε δύο ισόμορφες, μία πυρηνική 74 kDa και μία κυτταροπλασματική 54 kDa. Η τελευταία είναι πρωτεολυμένο παράγωγο της πρώτης από το οποίο απουσιάζει το εύκαμπτο καρβοξυτελικό άκρο. Η περιοχή αυτή ευθύνεται και για την μετακίνηση της πρωτεΐνης στον πυρήνα αφού περιέχει την NLS (*nuclear localization signal*) αλληλουχία. Έτσι το μετάλλαγμα PARN(1-523) στερείται της περιοχής 631-639 και αρα δεν μπορεί να εισέλθει τον πυρήνα. Άρα η μειωμένη ενεργότητα που παρατηρήθηκε στη δράση του ενζύμου οφείλεται σε έλλειψη της περιοχής 524-631. Στο μεταλλαγμένο ένζυμο περιέχεται ο τομέας RRM (σύνδεση με τη καλύπτρα) και ο τομέας εξωνουκλεάσης (υπεύθυνος για τον καταλυτικό μηχανισμό).

Συμπερασματικά, κατασκευάστηκε ένα μετάλλαγμα της PARN που σχεδιάστηκε να διατηρεί τα καταλυτικά αμινοξέα, καθώς και αυτά που εμπλέκονται στην πρόσδεση του καλύμματος του 5', στερείται όμως του καρβοξυτελικού άκρου του ενζύμου αγρίου τύπου. Το

μετάλλαγμα PARN(1-523) έχει μειωμένη δραστικότητα σε σχέση με το πλήρες ένζυμο, γεγονός που υπαινίσσεται πως το καρβοξυτελικό άκρο συμμετέχει στην πρόσδεση του υποστρώματος.

Προοπτικές, μελλοντικός σχεδιασμός

Μελλοντικά, σκοπεύουμε να μελετήσουμε την επίδραση της μετάλλαξης 1-523 στην επεξεργαστικότητα του ενζύμου. Επίσης, είναι δυνατό να πραγματοποιηθούν πειράματα για να εξακριβωθεί αν το καρβοξυτελικό άκρο συμμετέχει στον ολιγομερισμό του ενζύμου. Τέλος, σχεδιάζονται μελέτες *in vivo* σε κύτταρα για να διαπιστωθεί αν όντως η μειωμένη ενεργότητα της έχει επίδραση στα επίπεδα των mRNAs που είναι γνωστό πως επηρεάζονται από την PARN.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Garneau N, Wilusz J, Wilusz C (2007). "The highways and byways of mRNA decay". Nature reviews, Molecular cell Biology vol.8
2. Banerjee, A.K. 5'-Terminal cap structure in eukaryotic messenger ribonucleic acids. (1980) Microbiol. Rev. 44: 175–205
3. Darnell JE, Philipson L, Wall R, Adesnik M. Poly(A)denylic acid sequences: role in conversion of nuclear RNA into messenger RNA. (1971) Science 29:174(8):507–5
4. Fan J., Yang X., Wang W., Wood WH 3rd, Becker K.G., Gorospe M. Global analysis of stress-regulated mRNA turnover by using cDNA arrays. (2002) Proc Natl Acad Sci USA. 16: 10611-10616
5. Cheadle C., Fan J., Cho-Chung Y.S., Werner T., Ray J., Do L., Gorospe M., Becker K.G. Control of gene expression during T cell activation: alternate regulation of mRNA transcription and mRNA stability. (2005) BMC Genomics.
6. Cougot N, Babajko S, Seraphin B (2004). "Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells". J Cell Biol 165, 31-40
7. Goldstrohm A.C., Wickens M.. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. (2008) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9: 337–344
8. He F., Li X., Spatrick P., Casillo R., Dong S., Jacobson A. Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5' to 3' mRNA decay pathways in yeast. (2003) MolCell . 6: 1439–1452

9. Houalla R., Devaux F., Fatica A., Kufel J., Barrass D., Torchet C., Tollervey D. Microarray detection of novel nuclear RNA substrates for the exosome. (2006) *Yeast*. 6: 439–454
10. Liu J., Carmell MA., Rivas FV., Marsden C.G., Thomson J.M., Song J.J., Hammond S.M., Joshua-Tor L. & Hannon G.J. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. (2004) *Science*. 305: 1437–1441
11. Song J.J., Smith S.K., Hannon G.J. & Joshua-Tor L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. (2004) *Science*. 305: 1434–1437
12. Bianchin C., Mauxion F., Sentis S., Séraphin B., Corbo L. Conservation of the deadenylase activity of proteins of the Caf1 family in human. (2005) *RNA*. 11: 487-94
13. Thore S., Mauxion F., Seraphin B. & Suck D. X-ray structure and activity of the yeast Pop2 protein: a nuclease subunit of the mRNA deadenylase complex. (2003) *EMBO Rep*. 4: 1150–1155
14. Doidge R, Mittal S, Aslam A, Winkler GS. Deadenylation of cytoplasmic mRNA by the mammalian Ccr4-Not complex. (2012) *BiochemSoc Trans*
15. Faber A. W., Van Dijk M., Raue H. A. & Vos J.C. Ngl2p is a Ccr4p-like RNA nuclease essential for the final step in 3'-end processing of 5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. (2002) *RNA*. 8: 1095–1101
16. Deni C. L. & Chen J. The CCR4–NOT complex plays diverse roles in mRNA metabolism. (2003) *Prog. NuClic Acid Res*. 73: 221–250

17. Wagner E., Clement S.L. &Lykke-Andersen J. An unconventional human CCR4–CAF1 deadenylase complex in nuClearcajal bodies. (2007) Mol. Cell Biol. 27: 1686–1695
18. Morita M. et al. Depletion of mammalian CCR4b deadenylase triggers elevation of the p27Kip1 mRNA level and impairs cell growth. (2007) Mol. Cell Biol. 27: 4980–4990
19. Goldstrohm A.C., Hook B.A., Seay D.J. &Wickens, M. PUF proteins bind Pop2p to regulate messenger RNAs. (2006) Nature Struct. Mol. Biol. 13: 533–539
20. Lejeune F., Li, X. &Maquat, L. E. Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonuCleolytic activities. (2003) Mol. Cell. 12: 675–687
21. Chen C.Y. &Shyu, A.B. Rapid deadenylation triggered by a nonsense codon precedes decay of the RNA body in a mammalian cytoplasmic nonsense-mediated decay pathway. (2003) Mol. Cell Biol. 23: 4805–4813
22. Hilgers V, Teixeira D, Parker R. Translation-independent inhibition of mRNA deadenylation during stress in *Saccharomyces cerevisiae*. (2006) RNA
23. Conrad N.K., Shu M.D., Uyhazi K.E. &Steitz J.A. Mutational analysis of a viral RNA element that counteracts rapid RNA decay by interaction with the poly(A)denylate tail. (2007) Proc. Natl Acad. Sci. 104: 10412–10417
24. Eulalio A., Behm-Ansmant I. &Izaurralde E. P bodies: at the crossroads of posttranscriptional pathways. (2007) Mol. Biol. Cell. 8: 9–22

25. Conrad N.K., Shu M.D., Uyhazi K.E. &Steitz J.A. Mutational analysis of a viral RNA element that counteracts rapid RNA decay by interaction with the poly(A)denylate tail. (2007) *Proc. Natl Acad. Sci.* 104: 10412–10417
26. Kim J.H. & Richter J.D. Opposing polymerase-deadenylase activities regulate cytoplasmic poly(A)denylation. (2006) *Mol. Cell.* 24: 173–183
27. Ezzeddine N. et al. Human TOB, an antiproliferative transcription factor, is a PABPdependent positive regulator of cytoplasmic mRNA deadenylation. (2007) *RNA.* 27: 1084–1091
28. Hook B.A., Goldstrohm, A.C., Seay, D. J. &Wickens, M. Two yeast PUF proteins negatively regulate a single mRNA. (2007) *J. Biol. Chem.* 282: 15430–15438
29. Voeltz G.K., Ongkasuwan J., Standart N. &Steitz J. A novel embryonic poly(A) binding protein, ePAB, regulates mRNA deadenylation in *Xenopus* egg extracts. (2001) *Genes Dev.* 15: 774–788
30. Balatsos N.A., Nilsson P., Mazza C., Cusack S. & Virtanen A. Inhibition of mRNA deadenylation by the nuClear cap binding complex (CBC). (2006) *J. Biol. Chem.* 281: 4517–4522
31. Funakoshi Y. et al. Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases. (2007) *Genes Dev.* 21: 3135–3148
32. Standart N. & Jackson R. J. MicroRNAs repress translation of m7Gppp-capped target mRNAs in vitro by inhibiting initiation and promoting deadenylation. (2007) *Genes Dev.* 21: 1975–1982

33. Colegrove-Otero L.J., Minshall N. & Standart N.. RNA-binding proteins in early development. (2005) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 40: 21–73

34. Behm-Ansmant I. et al. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4: NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. (2006) *Genes Dev.* 20: 1885–1898

35. Emiliano P. Ricci et al. Activation of a microRNA response in trans reveals a new role for poly(A) in translational repression. (2011) *NuCleic Acids Res.* 17: 1093

36. Alan R. Godwin, Shihoko Kojima, Carla B. Green, Jeffrey Wilusz. Kiss your tail goodbye: The role of PARN, Nocturnin, and Angel deadenylases in mRNA biology(2013)*Biochimica et Biophysica Acta*

37. Berndt H, Harnisch C, Rammelt C, et al. (2012). Maturation of mammalian H/ACA box snoRNAs: PAPD5-dependent adenylation and PARN-dependent trimming. *RNA*18:958–72.

38. A.C. Goldstrohm, M. Wickens, Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 337–344.

39. M. Wu, M. Reuter, H. Lilie, Y. Liu, E. Wahle, H. Song, Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN, *EMBO J.* 24 (2005) 4082–4093.

40. Yang W. (2011). *NuCleases: diversity of structure, function and mechanism.* *Q Rev Biophys* 44:1–93.

41. Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, et al. (2011). CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins. *NuCleic Acids Res* 39:D225–9.
42. Eckmann CR, Rammelt C, Wahle E. (2011). Control of poly(A) tail length. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2:348–61.
43. Lee JE, Lee JY, Trembly J, et al. (2012). The PARN deadenylase targets a discrete set of mRNAs for decay and regulates cell motility in mouse myoblasts. *PLoS Genet* 8:e1002901.
44. P. Maragozidis, M. Karangeli, M. Labrou, G. Dimoulou, K. Papaspyrou, E. Salataj, S. Pournaras, P. Matsouka, K.I. Gourgoulialis, N.A. Balatsos, Alterations of deadenylase expression in acute leukemias: evidence for poly(a)-specific ribonuclease as a potential biomarker, *ActaHaematol.* 128 (2012) 39–46.
45. T. Nagata, S. Suzuki, R. Endo, M. Shirouzu, T. Terada, M. Inoue, T. Kigawa, N. Kobayashi, P. Güntert, A. Tanaka, Y. Hayashizaki, Y. Muto, S. Yokoyama, The RRM domain of poly(A)-specific ribonuclease has a noncanonical binding site for mRNA cap analog recognition, *NuCleic Acids Res.* 36 (2008) 4754–4767.
46. Vlachakis D., Pavlopoulou A., Tsiliki G., Komiotis D., Stathopoulos C., Balatsos N.A.A., Kossida S. An Integrated *In Silico* Approach to Design Specific Inhibitors Targeting Human Poly(A)-Specific Ribonuclease. *PLoS ONE* 7(12): e51113 (2012)
47. Balatsos N.A., Nilsson P., Mazza C., Cusack S. & Virtanen A. Inhibition of mRNA deadenylation by the nuclear cap binding complex (CBC). (2006) *J. Biol. Chem.* 281: 4517–4522

48. Copeland PR and Wormington M. The mechanism and regulation of deadenylation: Identification and characterization of *Xenopus* PARN. *RNA* 7,875–886 (2001).
49. Cheng Y, Liu WF, Yan YB, Zhou HM. A nonradioactive assay for poly(A)-specific ribonuclease activity by methylene blue colorimetry. *Protein Pept. Lett.* 2006;13(2):125-8.
50. Marcelo Lopez-Lastra, Andrea Rivas and Maria Ines Barria. Protein synthesis in eukaryotes: The growing biological relevance of cap-independent translation initiation.